

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CALCIUM ET ALEXINE

par le Dr O. GENGOU.

(Laboratoire d'Hygiène de l'Université de Bruxelles
[Directeur : professeur M. MILLET].)

La teneur du sang en calcium, ainsi que l'état dans lequel celui-ci s'y présente, ont fait l'objet, comme on le sait, de nombreuses investigations. La plupart des auteurs admettent qu'il s'y trouve sous trois formes : ionisé, non ionisé, uni aux protéines plasmatiques.

On n'ignore pas que le taux de la calcémie est quelque peu variable suivant les espèces animales ; il en est de même de la forme sous laquelle elle se présente. D'après P. Rona et D. Takahashi [21], le calcium total du plasma de cheval, exprimé en CaO, est de 0,0160 g pour 100 cm³, dont 35 p. 100 sous forme non diffusible. 100 cm³ de plasma en contiennent, chez le porc, 13 mg dont 25 p. 100 non diffusible ; chez le bœuf, respectivement 13 mg et 22 p. 100.

Ces données correspondent, suivant les espèces, à 0,012 g et à 0,0092 de Ca pour 100 cm³ de plasma, taux très voisins de 0,010 g trouvé par A. Quick [19] pour le chien et le lapin.

D'autre part, divers auteurs ont recherché le rôle joué par le calcium — ou l'une de ses formes — dans le fonctionnement normal de l'alexine sérique. Leurs conclusions sont loin d'être concordantes ; certaines sont, en outre, peu nettes.

C'est l'obstacle que les sels décalcifiants, notamment les oxalates et citrates alcalins, opposent à l'hémolyse par l'alexine qui leur

a servi habituellement de donnée expérimentale. D'autres fois, ils ont écarté le calcium par la dialyse soit du sérum, soit de certains des composants de l'alexine artificiellement isolés.

Gengou [4] a émis l'avis que l'action empêchante exercée par le citrate et l'oxalate sodiques n'est pas due à leurs propriétés anticalciques ; conséquemment, que le calcium ne paraît pas nécessaire à l'hémolyse par l'alexine.

Wright et Mac Callum [28] ont exprimé le même avis. A. Quick [48] se ralliant à la même opinion, ajoute que le calcium, indispensable comme la thromboplastine à la transformation de la prothrombine en thrombine, n'est pas nécessaire au fonctionnement de l'alexine.

J. Gordon, H. R. Whitehead et A. Wormall [6] constatent que la dialyse contre l'eau physiologique, soit du sérum, soit de ses globulines ou de ses albumines, n'inactive par l'alexine. Ils en concluent que le calcium non diffusible, contrairement au calcium diffusible, paraît en quelque relation avec elle. Ultérieurement, J. Gordon et W. R. Atkin [7] semblent admettre que le calcium n'intervient pas dans l'activité de l'alexine.

Pour A. Waldworth, F. et E. Maltaner [27], au contraire, si l'enlèvement du calcium par la dialyse en milieu neutre n'inactive pas l'alexine, il n'en est pas de même de la dialyse des albumines sériques en milieu acide. Dans ces conditions, le quatrième composant de l'alexine, que renferment ces albumines, est inactivé.

L. Pillemer et E. E. Ecker [46] ont objecté à cette opinion que les acides susceptibles d'enlever assez de calcium pour inactiver le quatrième composant, altèrent notablement ce dernier, par suite de la concentration de l'ion H.

Corroborant l'opinion de J. Gordon et al., ces auteurs concluent que le calcium ionisé n'est pas associé au quatrième composant de l'alexine. Ils ajoutent qu'on admet généralement que le calcium sérique est lié à la fonction alexique, mais que son rôle n'est pas élucidé. Il ne paraît pas, disent-ils, y avoir de relation nette entre le calcium uni aux protéines et le quatrième composant de l'alexine, le calcium étant peut-être une partie structurale des protéines qui portent ce composant, sans être vital pour sa fonction.

Ces travaux ne semblent donc pas attribuer au rôle joué par le calcium dans la fonction alexique de conclusion plus définitive que celle qu'a exprimée K. Deissler [3], pour qui un rapport existe entre le quatrième composant et le calcium non dialysable, attendu que ce dernier manque dans les sérums oxalatés.

Comme on le voit, ces auteurs se sont servis de l'hémolyse pour mesurer, après oxalatation ou citratation du sérum, l'activité ou la non-activité de l'alexine. Cependant, certains, comme Huddleson [40], Jersid [43], ont pris, comme test de cette acti-

tivité, après action des sels décalcifiants, l'opsonisation par les sérums frais. L'alexine y joue normalement, comme on le sait, un rôle essentiel.

L'unanimité, quant au rôle du calcium dans les fonctions de l'alexine, semble donc ne pas être faite. Cela ressort encore de l'opinion exprimée par Ole Maaløe [15] dans sa thèse. Il est assez naturel, dit cet auteur, d'expliquer l'action exercée par le citrate et l'oxalate sur l'activité de l'alexine sérique, comme une conséquence de la concentration de l'ion calcique. Tout en faisant observer (p. 126) les quantités considérables de ces corps, largement supérieures aux doses anticoagulantes, qui sont nécessaires pour combattre cette activité, cet auteur conclut qu'une certaine quantité de calcium libre est nécessaire au fonctionnement de l'alexine et de l'opsonine et que le calcium doit être considéré comme un « alexine and opsonine component ».

Aussi conçoit-on que, dans une même revue, deux auteurs aient émis récemment, à ce propos, des opinions opposées. Pour l'un, « le calcium n'est pas nécessaire à l'opsonisation » ; pour l'autre, « l'opsonisation naturelle... est entravée par la complète disparition du calcium ».

RECHERCHES PERSONNELLES.

DÉCALCIFICATION DU SÉRUM FRAIS. — I. *Emploi de l'oxalate sodique ou potassique.* — En recourant à cette méthode, nous n'avons jamais, quel que soit le volume de la solution oxalatée que l'on emploie pour décalcifier le sérum, dépassé dans les expériences où est éprouvée l'activité de l'alexine (par exemple par l'hémolyse), la concentration d'oxalate trouvée, par la méthode Hamburger, isotonique à NaCl 9 p. 1 000. Nous avons employé des solutions à 13,7 p. 1 000 pour l'oxalate sodique ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), 16,6 p. 1 000 pour l'oxalate potassique ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et 25,3 p. 1 000 pour le citrate sodique ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). Nous avons voulu éviter ainsi toute ingérence de l'hypertonie.

II. *Emploi de l'amberlite INC-50.* — A. Steinberg [24], A. Quick [19], dans leurs études sur la coagulation, ont montré que l'amberlite INC-100 enlève tout le calcium du sérum sanguin, auquel se substitue le sodium de l'échangeur.

Utilisant une technique analogue, M. Stefanini [23], ainsi que C. V. Hussey, A. J. Quick, M. Stefanini, C. F. Consolazio et F. Sergent [41] considèrent également que l'enlèvement du calcium est total, parce que l'amberlite est capable de rompre l'union relativement faible du calcium aux protéines ou à d'autres corps organiques.

Nous devons à l'obligeance de la firme Rohm et Haas Cy, Washington Square, Philadelphie 5, U. S. A. [Resinous products

division], d'avoir eu l'occasion d'utiliser l'amberlite INC-50 (1). Nous nous sommes servi de ce dernier, plutôt que de l'INC-100, sur la recommandation de la firme Rohm et Haas, le premier de ces produits étant mieux adapté, d'après cette firme, aux recherches que nous comptons entreprendre. C'est un échangeur d'ions, se présentant sous la forme de petits grains blancs opaques. Son activité dépend de ses groupes carboxyliques.

Nous inspirant des indications fournies par les auteurs précités, ainsi que par la firme Rohm et Haas, nous avons adopté pour l'utilisation de l'INC-50 le procédé suivant :

20 g d'amberlite en cycle acide, disposés dans un tube haut, large de 20 à 25 mm, sont traités par 250 cm³ NaOH N, puis par une quantité d'eau distillée suffisante pour que le Ph de l'effluent ne dépasse pas 7. On fait ensuite traverser l'amberlite par 100 cm³ NaCl 9 p. 1 000 afin d'éviter le trouble que pourrait apporter dans les expériences d'hémolyse, l'eau distillée comprise dans les pores de l'échangeur. Celui-ci est enfin conservé légèrement humide en flacons fermés et à l'obscurité, au laboratoire.

Bien que, d'après certains expérimentateurs, le traitement d'un sérum par l'amberlite ainsi préparé ne donne pas de bons résultats, quand on agite mécaniquement le mélange, nous avons cependant employé cette méthode avec succès. Contenu dans un tube bouché à l'émeri, le mélange est secoué assez vivement à raison de six fois deux minutes dans l'intervalle d'une heure (soit une fois toutes les dix minutes). Quoique ce traitement laisse le sérum parfaitement limpide, on le débarrasse par centrifugation de tout élément en suspension.

Recherche du calcium dans le sérum de cobaye ou de lapin soumis à une oxalatation croissante ou traité par l'amberlite. — Cette recherche a été faite par la méthode de F. F. Tisdall [25]. D'après de Waard [26], elle donne le calcium total, à la condition de laisser le précipité d'oxalate calcique se former pendant vingt-quatre heures, ainsi que le recommande P. Schimmelpfeng [22].

Des volumes identiques de sérum (1,8 cm³) sont oxalatés de 0,2 p. 1 000 à 16,6 p. 1 000 par addition de quantités adéquates de solutions d'oxalate potassique à 16,6 p. 100, le volume final (2 cm³) étant toujours uniformisé par l'addition d'eau physiologique. Par la centrifugation, on en obtient le lendemain une série de liquides limpides. La réaction de Tisdall y donne un trouble net jusqu'au mélange oxalaté à 0,8 p. 1 000 ; le précipité est douteux dans le mélange oxalaté à 1 p. 1 000 ; il n'en apparaît pas dans les suivants.

D'autre part, des volumes de 5 cm³ de sérum frais ont été agités, comme il vient d'être dit, avec des quantités décroissantes d'amberlite, allant de 1 g à 0,02 g. Après centrifugation, les liquides

(1) Nous remercions vivement M. Joseph E. Koroly, de la firme Rohm et Haas, d'avoir eu l'amabilité de nous l'adresser à titre gracieux.

décantés sont soumis à la réaction de Tisdall, puis mis à froid. Le lendemain, un précipité net se montre dans le tube témoin sans amberlite, de même que dans le tube additionné de 0,02 g de résine ; un précipité léger s'observe dans le suivant contenant 0,06 g de INC-50. Il n'en apparaît pas dans les autres, plus riches en amberlite.

Il semble donc que le sérum puisse être privé de calcium, soit par l'amberlite, utilisée en quantité appropriée, de même que par une oxalatation suffisante (2).

La méthode de Tisdall ne comportant pas d'incinération, nous avons prié le laboratoire de microchimie de l'Université de Bruxelles de rechercher le calcium dans une série d'échantillons de sérum de cobaye ou de lapin, traités par l'oxalate ou par l'amberlite, en utilisant les méthodes en usage dans ce laboratoire. Il a ainsi reçu les liquides limpides résultant de la centrifugation d'échantillons de 5 cm³ de sérum oxalatés de 1 p. 1 000 à 16,6 p. 1 000, des échantillons centrifugés de 5 cm³ de sérum traités par 0,2 g à 1 g d'amberlite, ainsi que du sérum non traité (témoin).

Nous transcrivons ci-après la technique suivie par le laboratoire de microchimie, ainsi que les résultats qu'il nous a transmis (3) :

Des échantillons oxalatés, on prélève 2,5 cm³, dont 9/10, soit 2,25 cm³ sont constitués par du sérum. On y ajoute 1,2 cm³ HNO₃ ($d = 1.4$) et VIII gouttes H₂O₂ et on procède à la *minéralisation complète*, suivie de l'évaporation à 3 reprises de 0,5 cm³ d'eau.

Les cendres sont redissoutes dans 2 cm³ d'eau ; la solution est précipitée à l'ébullition par 1,5 cm³ d'oxalate ammonique à 4 p. 100 + 1 cm³ H₃N 0,5 p. 100. Après trente minutes de repos, les eaux-mères sont éliminées par filtration inversée à l'aide du bâtonnet filtrant G³. Les précipités éventuels sont soumis à 3 lavages successifs avec un volume total de 2,5 cm³ d'eau ammoniacale saturée d'oxalate calcique.

Les précipités sont dissous dans 2,5 cm³ H₂SO₄N ; le titrage de calcium est fait à 70° à l'aide d'une solution MnO₄K.0,01 N.

Le calcium semble donc absent du sérum oxalaté à 3 p. 1 000,

(2) Tous les sérums, oxalatés ou traités par l'amberlite, ont été utilisés expérimentalement, après que l'on se fût assuré que la méthode de Tisdall y donnait un résultat négatif. D'après cet auteur, sa méthode n'expose qu'à une erreur inférieure à 0,1 p. 100 de la quantité de calcium sérique.

(3) Nous exprimons à M^{lle} A. Lacourt, directrice du laboratoire de microchimie, ainsi qu'à sa collaboratrice Mad. Franck, toute notre gratitude pour l'amabilité avec laquelle elles ont procédé à ces déterminations. Nous remercions également M^{lle} Lacourt d'avoir bien voulu vérifier les données transcrites ci-dessus.

CLINIQUE MÉDICALE
DES ENFANTS
B.I.L.

| | PRÉLÈVEMENT en cm ³ | MnO ₄ K. 0,01 N en cm ³ | Ca DANS 1 cm ³ en mg |
|---|-----------------------------------|--|--|
| Essai à blanc. | | 0,075 0,100 0,080 | |
| Sérum normal (témoin). . . . | 1,6 1,1 | 1,030 0,780 | 0,116 0,127 |
| Sérum oxalaté : | | | |
| A 1 p. 1 000 | 2,5 | 0,180 | 0,006 |
| A 2 p. 1 000 | | 0,090 | Douteux (limite des erreurs ex- périmentales). |
| A 3 p. 1 000 | | 0,080 | 0 |
| A 7 p. 1 000 | | 0,085 | 0 |
| A 11 p. 1 000 | | 0,100 | 0 |
| A 16,6 p. 1 000 | | 0,075 | 0 |
| Essai à blanc (5 cm ³ d'eau traitée par 1 g d'amberlite). | | 0,082 | |
| Sérum-amberlite : | | | |
| 0,2 g (pour 5 cm ³) | 2,5 | 0,070 | 0 |
| 0,5 g (pour 5 cm ³) | | 0,075 | 0 |
| 1 g (pour 5 cm ³) | | 0,070 | 0 |

A ces dilutions, le fer n'exerce aucune action.

peut-être même à 2,5 p. 1 000. Il paraît en être de même, ainsi que divers auteurs l'ont signalé, du sérum traité par l'amberlite employé en dose suffisante. On peut donc, grâce à ces procédés, rechercher si la disparition du calcium entraîne également la perte des propriétés que le sérum doit à son alexine. On peut rechercher s'il est encore apte à provoquer l'hémolyse, la bactériolyse (ex. le phénomène dit de Pfeiffer), la congutination par le sérum inactivé de bœuf (J. Bordet et P. Gay [2]), et l'opsonisation préalable à la phagocytose microbienne (A. Wright [29]).

Action hémolytique de l'alexine débarrassée de calcium. — Oxalatons de 4 p. 1 000 à 16,6 p. 1 000 des échantillons de 3,6 cm³ de sérum frais de cobaye par addition d'oxalate potassique. Eprouvons le pouvoir hémolytique, à 37°, de doses décroissantes des liquides fournis par la centrifugation (4), le volume de chaque tube étant porté à 1 cm³ par

(4) Dans nos expériences d'hémolyse, nous avons utilisé des globules de mouton lavés trois fois, puis sensibilisés par un tiers de leur volume de sérum lapin-antimouton inactivé ; après un séjour de trente minutes à 37°, ils sont lavés à l'eau physiologique oxalatée à 1 p. 1 000, puis à l'eau physiologique, et enfin dilués au tiers. Nous avons opéré de la sorte pour éviter l'intervention éventuelle du calcium globulaire, quoique, d'après Hamburger [9], le lavage des hématies en extrait le calcium, ce qui amène les auteurs à négliger celui-ci.

de l'eau physiologique. La lecture des résultats est faite après quarante minutes à 37° :

| Dose de sérum . . Sérum non oxalaté. Sérum oxalaté de 4 à 16,6 p. 1 000. | CENTIMÈTRE CUBE | | | | | | | |
|---|-----------------|------|----------|--------|------|------|------|----------|
| | 0,1 | 0,08 | 0,06 | 0,05 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | — |
| | H.c. | H.c. | H.p.p.c. | H.p.c. | H.n. | H.o. | H.o. | H.o. |
| | H.c. | H.c. | H.p.p.c. | H.t.n. | H.n. | H.o. | H.o. | H.o. (1) |

(1) H.c., hémolyse complète; H.p.c., hémol. presque compl.; H.t.n. : hémol. très nette; H.n. hémolyse nette; H.a.n : hémol. assez nette; H. fai : Hémol. faible; H. tr. fai; Hémol. très faible; H.o. Hémol. nulle.

Même oxalaté à 16,6 p. 1 000, alors que l'analyse ne décèle plus de calcium du moment que l'oxalation atteint 3 p. 1 000, le sérum, *dans les conditions expérimentales indiquées ci-dessus*, conserve donc son pouvoir hémolytique.

Un résultat identique s'obtient si l'on traite le sérum par l'amberlite, à raison de 0,40 g, 0,32 g, 0,26 g, 0,20 g pour 5 cm³ de sérum (5).

Mais, si *dans les conditions de ces expériences*, le sérum décalcifié se montre alexique, on peut cependant, en modifiant ces conditions, mettre en évidence l'action empêchante bien connue de l'oxalate et du citrate.

Oxalatons 3,6 cm³ de sérum frais à 16,6 p. 1 000 et déterminons son pouvoir hémolytique. Soit 0,08 cm³ à 0,1 cm³, la quantité nécessaire à la lyse totale, à 37° en une heure, de 0,05 cm³ de globules sensibilisés, le volume étant porté à 1 cm³ par de l'eau physiologique.

Reproduisons la même expérience avec 0,1 cm³ de ce sérum, en remplaçant, le volume total étant toujours porté à 1 cm³, des quantités croissantes de NaCl 9 p. 1 000 par des volumes équivalents de solutions isotoniques d'oxalate potassique (16,6 p. 1 000) ou de citrate sodique (25,3 p. 1 000). La lecture est faite après une heure à 37°.

Action empêchante de l'oxalate :

| Dose d'alexine oxal- latée à 16,6 p. 1 000. Oxalate, 16,6 p. 1 000. Eau physiologique . Résultats | CENTIMÈTRE CUBE | | | | | | | | | |
|---|-----------------|------|------|--------|------|---------|----------|------|------|------|
| | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| | — | 0,1 | 0,16 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,5 | 0,5 |
| | 0,9 | 0,8 | 0,75 | 0,7 | 0,65 | 0,6 | 0,55 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |
| | H.c. | H.c. | H.c. | H.p.c. | H.n. | H.as.n. | H.t.fai. | H.o. | H.o. | H.o. |

(5) Toutefois, le sérum ainsi traité perd approximativement 1/5 de son activité lytique.

Action empêchante du citrate :

| | CENTIMÈTRE CUBE | | | | | |
|--|-----------------|----------|---------|-------|------|-------|
| | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Dose d'alexine oxalatée à 16,6 p. 1 000. | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Citrate sodique à 25,3 p. 1 000 . . . | — | 0,1 | 0,16 | 0,2 | 0,25 | 0,3 |
| Eau physiologique | 0,9 | 0,8 | 0,75 | 0,7 | 0,65 | 0,6 |
| Résultats | H. c. | H. p. c. | H. fai. | H. o. | H. o | H. o. |

On obtient les mêmes résultats si, au lieu de sérum privé de calcium par oxalation à 16,6 p. 1 000, on utilise du sérum traité par l'amberlite, auquel on ajoute ensuite des doses croissantes d'oxalate potassique ou de citrate sodique.

Faisons agir sur la même dose (0,1 cm³) de la même alexine, mais dépouillée par l'amberlite de tout calcium décelable (voir note 2), des doses croissantes d'oxalate potassique ou de citrate sodique. Complétons à 1 cm³ le volume de chaque tube par de l'eau physiologique ; puis introduisons dans chacun d'eux 0,05 cm³ d'hématies sensibilisées. Les résultats sont lus après une heure à 37°.

Action empêchante de l'oxalate K :

| | CENTIMÈTRE CUBE | | | | | | |
|---|-----------------|-------|----------|---------|-------|-------|-------|
| | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,01 | 0,1 |
| Dose d'alexine à l'amberlite . . | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,01 | 0,1 |
| Oxalate K à 16,6 p. 1 000 . . . | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | — |
| Eau physiologique (q.s. pour 1 cm ³). | | | | | | | |
| Glob. sen. ib. | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Résultats | H. c. | H. c. | H. p. c. | H. fai. | H. o. | H. o. | H. c. |

Action empêchante du citrate Na :

| | CENTIMÈTRE CUBE | | | | | | |
|---|-----------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Dose d'alexine à l'amberlite. | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Citrate Na 25,3 p. 1 000 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | — | — |
| Eau physiologique (q.s. pour 1 cm ³). | | | | | | | |
| Glob. sensib. | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Résultats | H. p. c. | H. fai. | H. o. | H. o. | H. o. | H. o. | H. c. |

Il semble donc que l'absence de calcium *décelable* ne suffit pas pour empêcher l'action hémolytique de l'alexine. Pour entraver cette action, le milieu restant toujours isotonique, il faut qu'il contienne un poids déterminé d'oxalate ou de citrate. Dans un

volume de 1 cm³ contenant 0,1 cm³ d'alexine, cette quantité est, dans les expériences ci-dessus et dans les conditions où elles sont faites, de 8,34 mg d'oxalate potassique sec et de 5 mg de citrate sodique sec.

On peut montrer, du reste, que cette quantité varie avec la dose d'alexine utilisée dans un volume total de 1 cm³. Elle varierait également suivant le degré de sensibilisation des hématies, c'est-à-dire de leur avidité à s'emparer de l'alexine. L'alexine traitée par l'amberlite est particulièrement propre à démontrer ces faits.

Tout se passe donc comme si le pouvoir antihémolytique de l'oxalate et du citrate n'était pas dû à leurs propriétés anticalciques.

ACTION BACTÉRIOLYTIQUE DU SÉRUM FRAIS, DÉBARRASSÉ DE CALCIUM. — Ainsi qu'on peut le prévoir par l'étude précédente, le sérum frais de cobaye, privé de calcium par une oxalation suffisante ou par l'amberlite, reste apte à transformer en granule le vibron cholérique.

Sensibilisons par 0,5 cm³ de sérum inactivé de lapin anticholérique, 5 cm³ d'une suspension dans 10 cm³ d'eau physiologique, d'une culture de vingt-quatre heures de choléra (souche Nabab) sur gélose. Après centrifugation, lavons le sédiment deux fois à l'eau physiologique, puis remettons-le en suspension dans 5 cm³ de liquide (suspension A). Le reste de la suspension subit le même traitement, sauf qu'elle n'est pas sensibilisée (suspension B).

Traités par 0,05 cm³ d'alexine de cobaye et 0,6 cm³ d'eau physiologique, 0,2 cm³ de la suspension A subit le phénomène de Pfeiffer, tandis que la même quantité de la suspension B conserve la forme vibronnienne.

Oxaltons à 16,6 p. 1 000 3,6 cm³ de sérum et traitons-en en outre 4 cm³ par 0,16 g d'amberlite.

0,2 cm³ de la suspension A sont distribués dans une série de tubes, puis reçoivent soit des doses décroissantes de sérum normal, soit des doses correspondantes de sérum oxalaté ou de sérum traité par l'amberlite. Le volume final est toujours amené à 1 cm³ par addition d'eau physiologique. Une heure après la mise des tubes à 37°, on lit les résultats :

| | CENTIMÈTRE CUBE | | | | | |
|--------------------|-----------------|---------|---------|---------|----------|---------|
| | 0,15 | 0,125 | 0,1 | 0,075 | 0,05 | — |
| Dose d'alexine . . | Transf. | Transf. | Transf. | Transf. | Transf. | Pas de |
| Alexine normale . | tot. | tot. | tot. | tot. | tot. | transf. |
| Alexine oxalatée | Id. | Id. | Id. | Id. | Id. | Id. |
| Alexine amberlite. | Transf. | Transf. | Transf. | Transf. | Transf. | Id. |
| | tot. | tot. | incompl | incompl | incompl. | |

Dépouillée de son calcium, l'alexine se comporte donc au point de vue bactériolytique comme au point de vue hémolytique.

DÉPOUILLÉ DE CALCIUM, LE SÉRUM FRAIS RESTE CAPABLE DE PROVOQUER LA CONGLUTINATION. — J. Bordet et P. Gay [2] ont décrit sous ce nom l'agglomération que provoque le sérum inactivé de bœuf mis au contact d'hématies de chèvre sensibilisées et chargées d'alexine de cheval. Si celle-ci n'hémolyse pas les hématies, elle se fixe néanmoins sur elles. Traités ensuite par du sérum inactivé de bœuf, les globules s'agglomèrent en volumineux amas. La production de ce phénomène requiert de façon absolue la fixation de l'alexine sur les globules sensibilisés.

Nous avons montré (5) qu'il en est de même si on remplace les hématies par une suspension aqueuse d'amidon ou de mastic. Le premier de ces corps, aisément centrifugeable, se prête bien à l'expérimentation.

Recherchons si les sérums privés de calcium par l'amberlite se prêtent, tout comme les sérums originels, au phénomène de conglutination.

Traisons par 16 cg d'amberlite 4 cm³ de sérum frais de lapin et par 24 cg 6 cm³ de sérum inactivé de bœuf. Préparons également, par broyage, une suspension à 1-2 p. 100 d'amidon de riz dans l'eau physiologique oxalatée à 1 p. 1 000 et lavons-en le sédiment à deux reprises avec ce liquide. Vérifions par la méthode de Tisdall, l'absence de calcium aussi bien dans les sérums que dans la suspension d'amidon.

Des doses décroissantes de sérum normal de lapin sont additionnées d'un volume constant (0,4 cm³) de sérum inactivé de bœuf, d'une quantité constante (0,1 cm³) de la suspension d'amidon, le volume final étant porté, dans chaque tube, à 1 cm³ par addition d'eau physiologique.

On prépare de même une série de tubes où le sérum normal de lapin et le sérum inactivé de bœuf sont remplacés par les mêmes sérums traités par l'amberlite, à raison de 4 cg par centimètre cube de sérum.

Les résultats sont lus après trois heures de séjour à 37° :

| | CENTIMÈTRE CUBE | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|-------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
| | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | — |
| Dose de sérum de lapin | Congl. tot. | Congl. tot. | Congl. tot. | Congl. pr. tot. | Cong. fai. | Pas de cong. |
| Sérum normal. . . | Congl. tot. | Congl. tot. | C. ass. fai. | Congl. fai. | Pas de cong. | Id. |
| Sérum traité par l'amberlite. . . | | | | | | |

Privé de calcium par l'amberlite, le sérum frais de lapin (ou

de cobaye) provoque donc néanmoins la congglutination de l'amidon par le sérum inactivé de bœuf traité de la même façon. Toutefois, comme nous l'avons fait observer précédemment, son pouvoir alexique est quelque peu affaibli.

On peut empêcher ce phénomène, si le milieu contient une quantité suffisante d'oxalate.

Des quantités de 0,7 cm³ de sérum frais de lapin sont oxalatées par un volume identique (0,035 cm³) de solutions d'oxalate potassique échelonnées de 16,6 p. 100 à 1 p. 100, de façon à oxalater le sérum de 8 p. 1 000 à 0,5 p. 1 000. On traite de même du sérum inactivé de bœuf.

A un volume constant (0,3 cm³) de ces sérums de lapin, diversement oxalatés, on mélange une quantité constante (0,3 cm³) de sérum inactivé de bœuf, également oxalaté de 8 p. 1 000 à 0,5 p. 1 000. On ajoute 0,1 cm³ de suspension d'amidon à 2 p. 100 oxalatée à 1 p. 1 000 ; le volume final est porté, dans chaque tube, à 1 cm³ par addition d'eau physiologique. Les résultats sont lus après un séjour de trois heures à 37° :

| Sérums oxalatés à . | OXALATATION (POUR 1 000) | | | | | |
|---------------------|--------------------------|---|---|---------------------|----------------|-----|
| | 8 | 6 | 4 | 2 | 1 | 0,5 |
| | Pas de congglutination. | | | Congl. assez nette. | Congl. totale. | |

On obtient les mêmes résultats, si on emploie du sérum frais de lapin et du sérum inactivé de bœuf, préalablement traités par l'amberlite, puis soumis à une oxalation croissante.

DÉBARRASSÉ DE CALCIUM, LE SÉRUM NORMAL FRAIS RESTE CAPABLE DE PROVOQUER L'OPSONISATION. — A. Wright [29] a montré que la phagocytose microbienne est considérablement renforcée lorsque le milieu où elle s'opère contient du sérum frais. C'est le phénomène de l'opsonisation.

La phagocytose reste faible, au contraire, quand, au lieu de sérum frais, on emploie du sérum inactivé de même espèce ou de l'eau physiologique.

Aussi, le rôle de l'alexine des sérums normaux dans l'opsonisation des éléments soumis à la phagocytose est-il communément admis. Or, on obtient les mêmes résultats si, au lieu d'employer du sérum frais, on le dépouille, au préalable, de son calcium.

Traisons du sérum de cobaye par l'amberlite, à raison de 4 cg par centimètre cube de sérum.

Préparons en outre une suspension de leucocytes de cobayes par injection intrapéritonéale de bouillon. L'exsudat, recueilli quatre heures

après, est oxalaté par addition de 1/10 de son volume d'oxalate de potassium 16,6 p. 100 ; les leucocytes en sont lavés deux fois à l'eau physiologique oxalatée à 1,66 p. 1 000, puis remis dans une quantité d'eau physiologique égale au 1/10 du volume de l'exsudat.

On prépare de même une suspension de staphylocoques en délayant une culture de vingt-quatre heures sur gélose dans 10 cm³ d'eau physiologique oxalatée à 1,66 p. 1 000. La suspension est ensuite diluée au quart ; on fait les mélanges indiqués ci-après :

Les tubes sont mis à 37°. Après vingt minutes on en fait des frottis, que l'on colore par la méthode de Gram. On détermine pour chaque tube, le pouvoir opsonique.

| | QUANTITÉS EN CENTIMÈTRES CUBES | | | | | |
|---|--------------------------------|------|------|------|------|------|
| | | | | | | |
| Sérum inactivé à 55° | 0,15 | — | — | 0,15 | — | — |
| Sérum frais | — | 0,15 | — | — | 0,15 | — |
| Sérum amberlite | — | — | 0,15 | — | — | 0,15 |
| Emulsion microbienne | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Suspension leucocytaire | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| Pouvoir opsonique : | | | | | | |
| 1 ^{re} et 2 ^e expériences | 0,23 | 3,8 | 3,5 | 0,87 | 10,9 | 8,3 |
| 3 ^e expérience | 0,78 | 14,0 | 16,5 | | | |
| 4 ^e expérience | 1,0 | 16,4 | 13,4 | | | |

P. Govaerts [8] a observé l'agglomération très rapide par les plaquettes sanguines de certains microbes injectés dans le torrent circulatoire. Il en est ainsi, chez le lapin, du staphylocoque et du paratyphus B. Transposant *in vitro* cette expérience, il a démontré que l'emplaquettement de ces germes exige la présence, soit de plasma oxalaté à 1 p. 1 000, soit de sérum frais de même espèce. Ce phénomène ne s'observe pas, au contraire, si plasma oxalaté et sérum frais sont remplacés par de l'eau physiologique ou par du sérum inactivé.

L'alexine du sérum frais joue donc dans ce cas le même rôle que dans l'opsonisation de Wright.

Or, il en est encore de même quand le sérum frais est privé de calcium par l'amberlite.

Du sérum frais de lapin est traité par l'amberlite, à raison de 4 cg par centimètre cube de sérum.

On prépare en même temps une suspension de paratyphus B en délayant dans 5 cm³ d'eau physiologique oxalatée à 1,66 p. 1 000 une culture de vingt-quatre heures sur gélose inclinée. On la débarrasse par centrifugation des grumeaux qu'elle contient.

Les plaquettes sanguines sont obtenues par la technique habituelle : prélèvement chez le lapin de sang carotidien que l'on recueille dans 1/10 de son volume d'oxalate sodique 1 p. 100 ; centrifugation modérée

de trois minutes, donnant un plasma riche en plaquettes ; centrifugation énergique de ce plasma pendant trente minutes donnant, sous un plasma limpide, un sédiment de plaquettes qu'on lave deux fois à l'eau physiologique oxalâtée à 1,66 p. 1 000, puis qu'on remet en suspension dans un volume de celle-ci égal à 1/10 du volume sanguin initial.

On dispose l'expérience comme suit :

| | QUANTITÉS EN CENTIMÈTRE CUBE | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------------------|-------|------|--------|-------|------|--------|-------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Numéros des tubes . . . | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Sérum à 55° | 0,3 | 0,3 | 0,3 | — | — | — | — | — | — |
| Sérum amberlite | — | — | — | 0,3 | 0,3 | 0,3 | — | — | — |
| Sérum frais | — | — | — | — | — | — | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Suspension microbienne | 0,0375 | 0,075 | 0,15 | 0,0375 | 0,075 | 0,15 | 0,0375 | 0,075 | 0,15 |
| Plaquettes | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |

Les tubes sont mis à 37° ; après vingt minutes, puis après une heure, on en fait des frottis que l'on colore au violet de gentiane.

Résultats après vingt minutes :

Tubes 1-3 : plaquettes et microbes sont isolés les uns des autres ;

Tube 4 : petits paquets peu nombreux contenant plaquettes et microbes ;

Tube 5 : paquets nombreux contenant plaquettes et microbes ;

Tube 6 : paquets très nombreux contenant plaquettes et microbes ; on peut généralement distinguer les limites individuelles des plaquettes ;

Tubes 7-9 : gros flocons formés de plaquettes et de microbes.

Résultats après une heure : les résultats sont identiques ; cependant dans les tubes 4 et 5, les plaquettes agglomérées perdent leurs limites propres, fusionnant en une masse amorphe, dans laquelle l'on aperçoit les bacilles.

En conséquence, dépouillé de son calcium, le sérum frais de cobaye ou de lapin conserve la propriété, qu'il doit à son alexine, d'opsoniser les éléments destinés à être phagocytés par les polynucléaires ou à être agglomérés par les plaquettes sanguines.

En résumé, si l'on dépouille le sérum frais de cobaye de son calcium, au point que des réactions, comme la méthode de Tisdall, même accompagnée de la minéralisation, n'en décèlent plus de trace dosable, on ne lui enlève pas les propriétés qu'il doit à son alexine.

Il en est ainsi notamment quand le sérum est oxalaté, tout en restant dans les limites de l'isotonicité, de manière à le priver de calcium.

Dans ces conditions, l'alexine demeure hémolytique et bactériolytique ; elle reste apte à provoquer la congutination par le

sérum de bœuf, de même qu'à opsoniser les éléments destinés à être phagocytés.

Pour que l'oxalate empêche les actions dues à l'alexine, il faut que le milieu où elles s'effectuent en contiennent une dose largement supérieure à celle qui le prive de tout calcium décelable. Cette dose s'accroît avec la quantité d'alexine employée, de même qu'avec l'avidité que manifestent à s'emparer de celle-ci les éléments soumis à son action.

Tout se passe, en somme, comme si les oxalates alcalins ne devaient pas leur propriété antilytique à la précipitation du calcium sérique.

Sous réserve de traces indosables de calcium, que les réactifs chimiques peuvent laisser dans les sérums, l'expérience ne paraît donc pas plaider en faveur du caractère *nécessaire* qu'aurait l'intervention du calcium dans les phénomènes dus à l'alexine.

La décalcification du sérum par l'amberlite est également propre à démontrer ces faits. Elle autorise en outre à penser que l'inhibition due au citrate sodique ne paraît pas davantage relever de son action anticalcique.

Gengou [4] a émis précédemment l'hypothèse que l'obstacle opposé par les oxalates et les citrates aux actions dues à l'alexine résultait peut-être d'une action directe de ces corps sur l'alexine, avec laquelle ils formeraient un complexe (6).

Ainsi que le recommande E. Ponder [17], ces conclusions ne concernent évidemment que les phénomènes étudiés dans la présente note. Leur généralisation à d'autres faits ne se justifierait que si des recherches expérimentales plus étendues le permettaient.

Je suis très reconnaissant à M. le professeur Millet des facilités qu'il m'a données pour effectuer ce travail.

(6) Une opinion comparable a été également formulée par divers auteurs à propos d'autres phénomènes physiologiques. A. Quick et M. Stefanini [20], Inouye [12] pensent que l'action anticoagulante du citrate résulte tout d'abord de la combinaison de celui-ci avec la prothrombine, qu'il inactive. Son action anticalcique ne serait que secondaire, exigeant une concentration plus forte.

Cette conception peut vraisemblablement être rapprochée de l'opinion d'après laquelle l'oxalate peut inhiber, en milieu acide, la phosphatase des extraits de foie (Jacobsen [14], Belfanti et al. [1], inhibition que ces derniers attribuent à la formation d'un complexe oxalate-enzyme aisément réversible.

E. Ponder [17] signale, de son côté, que l'oxalate, utilisé comme anticoagulant, déprime la glycolyse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. BELFANTI, A. CONTARDI et A. ERGOLI. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 517.
- [2] J. BORDET et P. GAY. *Ces Annales*, 1908, **22**, 625.
- [3] K. DEISSLER. *Zeitschr. Immun.*, 1931-1932, **73**, 365.
- [4] O. GENGOU. *Arch. intern. Physiol.*, 1908, **7**, 1 ; *Centralbl. Bakt. Ref.*, 1909, **43**, 401.
- [5] O. GENGOU. *Zeitschr. Immun.*, 1911, **6**, 725.
- [6] J. GORDON, H. PR. WHITEHEAD et A. WORMALL. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 1036.
- [7] J. GORDON et W. R. ATKIN. *Brit. J. exp. Pathol.*, 1941, **22**, 226.
- [8] P. GOVAERTS. *Arch. intern. Physiol.*, 1921, **16**, 4.
- [9] H. J. HAMBURGER. *Z. f. physik. Chem.*, 1910, **69**, 663.
- [10] I. F. HUDDLESON : cité d'après OLE MAALÖE. *Inst. sérothér. danois*, 1946, **36**.
- [11] C. V. HUSSEY, A. J. QUICK, M. STEFANINI, C. F. CONSOLAZIO et F. SERGENT. *Biol. Chem.*, 1950, **184**, 105.
- [12] INOUE. *J. Biochem.*, 1928, **10**, 133.
- [13] P. M. JERSILD : cité d'après OLE MAALÖE. *Inst. sérothér. danois*, 1946, **36**.
- [14] E. JACOBSEN. *Biochem. Zeitschr.*, 1932, **249**, 21.
- [15] OLE MAALÖE. *Inst. sérothér. danois*, 1946, **36**.
- [16] L. PILLEMER et E. E. ECKER. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 401.
- [17] E. PONDER. *Hemolysis and related phenomena*. Londres. Churchill. 1948.
- [18] A. QUICK. *J. Immunol.*, 1935, **29**, 87.
- [19] A. QUICK. *Am. J. Physiol.*, 1947, **148**, 211.
- [20] A. QUICK et M. STEFANINI : cité d'après C. V. HUSSEY et AL. *Biol. Chem.*, 1950, **184**, 105.
- [21] P. RONA et D. TAKAHASHI. *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **31**, 336.
- [22] P. SCHIMMELPFENG. *Biochem. Zeitschr.*, 1927, **183**, 42.
- [23] M. STEFANINI. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1948, **67**, 22.
- [24] A. STEINBERG. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1944, **56**, 124.
- [25] F. F. TISDALL. *J. biol. Chem.*, 1923, **56**, 439.
- [26] D. J. DE WAARD. *Biochem. Zeitschr.*, 1919, **97**, 186.
- [27] A. WALDWORTH et F. et E. MALTANER. *J. Immunol.*, 1936, **30**, 417.
- [28] A. E. WRIGHT et Mc CALLUM. *J. Path. a. Bact.*, 1922, **25**, 316.
- [29] A. E. WRIGHT. *Studies of immunisation*, 1944.

LES GROUPES SANGUINS DES MOUTONS

par R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, A. EYQUEM et P. MILLOT (*).

(*Institut Pasteur.*)

Les antigènes des groupes sanguins des moutons ont déjà fait l'objet de travaux parmi lesquels il convient de rappeler ceux de Todd et White [1], qui ont établi l'existence de différences individuelles chez les moutons à l'aide d'iso-immun-hémolysines de bœuf absorbées par des globules rouges de différents moutons. En 1924, Bialosuknia et Kaeskowski [2] ont mis en évidence, à l'aide d'iso-agglutinines naturelles un antigène A permettant de diviser les moutons en trois groupes sanguins en se fondant sur la présence ou l'absence de cet agglutinogène ou de l'agglutinine correspondante. La répartition des groupes sanguins différait suivant la race examinée. L'iso-immunisation d'animaux ne possédant pas l'antigène A, à l'aide de globules rouges du groupe A permettait d'obtenir des iso-immunsérums. Brébant (1932) [3] a obtenu des résultats analogues. Andersen [4] a établi, en 1938, que l'antigène principal était composé d'un certain nombre d'agglutinogènes secondaires. L'étude des iso-immunsérums de moutons et des hétéro-immun-agglutinines de lapin anti-globules rouges de mouton a montré à Andersen que ces anticorps permettaient de mettre en évidence des propriétés différentes de celles reconnues à l'aide des iso-agglutinines naturelles.

Stormont, en 1951 [5], a repris l'étude du système des groupes sanguins R — O chez les moutons. Il a constaté que les globules rouges du groupe O pouvaient être distingués à l'aide d'anticorps normaux d'origine bovine. Il a confirmé par l'examen de 100 moutons que les caractères R et O s'excluaient mutuellement. Le caractère O ne pouvait être mis en évidence par l'épreuve d'absorption des anticorps à l'aide des globules rouges des moutons hétérozygotes pour les deux allélomorphes.

Les travaux de M. Ycas, en 1949 [6], ont apporté de nouvelles précisions sur la structure antigénique des globules rouges de mouton. Ces travaux ont abouti à l'isolement de cinq antigènes A, B, C, D et H révélés à l'aide d'iso-immun-agglutinines et de

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 avril 1952.

quatre antigènes E, F, G, K révélés à l'aide d'agglutinines de lapin anti-globules rouges de mouton.

Poursuivant nos recherches sur les groupes sanguins des animaux [7, 8], nous avons entrepris une étude systématique des relations antigéniques pouvant exister entre les ovidés et les capridés. Pour les ovins, nous avons tenté de mettre en évidence des différences antigéniques entre les individus de même race ou de race différente en utilisant soit les iso-agglutinines naturelles ou obtenues après immunisation, soit des hétéro-agglutinines obtenues par immunisation de chèvre, de lapin ou de cheval à l'aide de globules rouges de mouton.

Du point de vue technique, nous avons étudié l'action des sérums prélevés stérilement par ponction veineuse et conservés au congélateur à -20° . Les globules rouges prélevés stérilement ont été utilisés dans les cinq jours qui suivaient. Pour chaque sérum on a recherché la présence d'hémolysines, d'agglutinines actives sous forme complète, c'est-à-dire sur des globules rouges mis en suspension en eau physiologique, et actifs sous forme incomplète, révélables soit à l'aide de globules rouges dilués en milieu albumineux, soit à l'aide de la réaction de Coombs indirecte utilisant un sérum de lapin anti-globuline de mouton.

Les réactions d'iso-agglutination ont d'abord été effectuées sur les échantillons de sang provenant de 92 moutons répartis en lots d'une vingtaine. Ces moutons appartenaient surtout aux races de la Sologne, de l'Île de France, du Berry et de la Lorraine. On constatait l'existence d'iso-agglutination dans 25 p. 100 des combinaisons. Ces réactions d'agglutination étaient faciles à lire dans 10 p. 100 des cas et la moitié des sérums présentait une agglutinine active vis-à-vis de certains globules rouges. Ce premier examen nous a montré que le nombre des animaux à classer dans le groupe O est très faible.

Les épreuves d'hétéro-agglutination ont été réalisées en examinant l'action de 15 sérums de chèvre vis-à-vis d'échantillons de sang provenant de 21 moutons. Certains de ces sérums étaient actifs sur tous les globules rouges des moutons et possédaient donc une agglutinine hétéro-spécifique. Mais aucune concordance n'a pu être établie entre les antigènes mis en évidence d'une part, par les iso-agglutinines naturelles, d'autre part, par les hétéro-agglutinines de chèvre anti-mouton.

L'immunisation de 3 chèvres à l'aide d'un mélange de sangs provenant de 12 moutons a permis d'obtenir un développement de l'hétéro-agglutinine et l'apparition d'anticorps actifs sous forme incomplète décelés à l'aide du sérum anti-globuline de mouton.

Ces immunsérums caprins anti-ovin réagissent, en général, sur

les globules rouges de tous les ovins examinés, mais le titre d'agglutination des globules rouges diffère suivant la race à laquelle appartient l'animal examiné. Ainsi, en règle générale, les globules rouges des moutons appartenant à la race Boukhara sont agglutinés encore par une dilution au 1/2 000 du sérum de chèvre, alors que les globules rouges de moutons de la race des Préalpes ne sont agglutinés par le même sérum que s'il est dilué à moins de 1/8.

Nous avons tenté par des épreuves d'absorption d'individualiser les antigènes en présence.

L'étude des fractions de sérum de chèvre anti-mouton provenant de l'immunisation d'un bouc a donné des résultats particulièrement intéressants dont nous ne rapporterons que l'essentiel : l'absorption a permis d'obtenir 64 fractions de sérum dont on a examiné l'activité agglutinante, sous forme complète, vis-à-vis des globules rouges de 64 moutons appartenant aux différentes races. Nous avons pu constater que l'absorption à l'aide de globules rouges de moutons de certaines races laissait persister des anticorps actifs vis-à-vis des moutons d'autres races. Par exemple, l'absorption à l'aide des globules rouges de 7 des 10 moutons South-Downs a laissé persister un anticorps actif vis-à-vis de 12 sur 20 Préalpes et de 8 sur 9 Boukhara, ainsi qu'un anticorps vis-à-vis de la moitié des moutons Mérinos de Rambouillet.

Au contraire, l'absorption à l'aide des globules rouges des moutons d'Astrakan ou du Limousin entraîne à peu près la totalité des anticorps.

L'absorption par les globules rouges des Mérinos de Rambouillet entraîne pour 3 d'entre eux la totalité des anticorps ; il en est de même pour 2 sur 5 des Bizets et 14 sur 20 des Préalpes. Six moutons Préalpes n'absorbant pas la totalité des anticorps laissent persister des anticorps actifs sur les autres moutons Préalpes et les Boukhara, mais entraînent des anticorps actifs vis-à-vis des Mérinos de Rambouillet, des Limousins ou des South-Downs.

Ainsi, l'examen général des résultats obtenus à l'aide de ce sérum met en évidence l'individualité antigénique des différentes races de moutons.

L'étude d'hétéro-immunsérums d'ovins anti-caprin n'a pas permis de mettre en évidence des différences antigéniques chez les Ovins, ainsi que chez 5 mouflons de Corse (*Ovis musimon*).

L'étude à l'aide d'iso-immunsérums a été réalisée après immunisation de 5 brebis à l'aide du sang d'un bélier. Il a été ainsi possible d'obtenir 3 iso-immunsérums, l'un actif seulement sur les globules rouges du bélier donneur, l'autre actif en plus sur les globules rouges de 3 brebis et le troisième actif sur les

globules rouges de ces 4 animaux et d'une autre brebis. Mais ces iso-immunsérums présentaient un titre différent suivant la provenance des globules rouges de l'animal donneur.

Les épreuves d'iso-immunisation croisée ont porté sur 11 brebis dont 6 avaient déjà reçu du sang d'un bélier et 2 autres des globules rouges de chèvres. Cette iso-immunisation a permis d'obtenir 5 iso-immunsérums.

Au total, l'immunisation de différents moutons à l'aide de globules rouges provenant de 12 autres moutons, nous a permis d'obtenir 5 sérums particulièrement intéressants.

Le sérum 5 d'un titre maximum de 1/16 est actif sur 1 des 10 moutons.

Le sérum 12 d'un titre maximum de 1/128 est actif sur 8 des 10 moutons.

Le sérum 13 d'un titre maximum de 1/32 est actif sur 3 des 10 moutons.

Le sérum 16 d'un titre maximum de 1/32 est actif sur 1 des 10 moutons.

Le sérum 18 d'un titre maximum de 1/16 est actif sur 3 des 10 moutons.

Un premier examen de l'action des 3 sérums, 5, 12, 16 vis-à-vis des globules rouges de 42 moutons a montré que le sérum 12 agglutinait la plupart des échantillons de sang mais n'agglutinait pas 5 autres échantillons. Le sérum 5 n'agglutinait qu'un échantillon, alors que le sérum 16 en agglutinait 9.

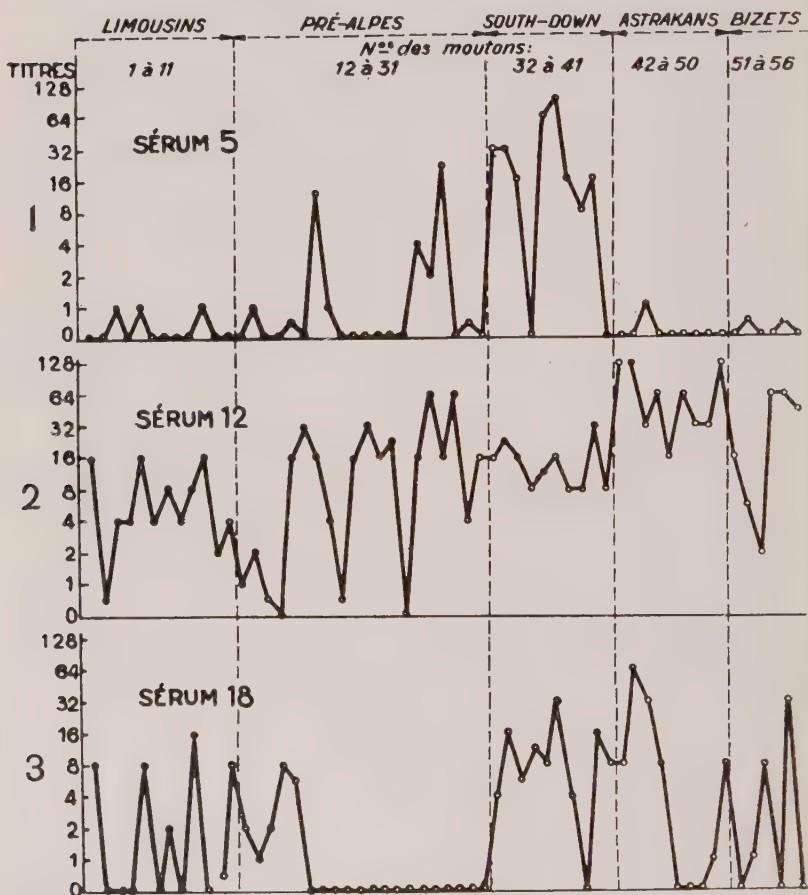
Une étude plus complète a été réalisée à l'aide d'échantillons de sang de 57 brebis appartenant aux races Limousine (12), Préalpe (20), South-Down (10), Boukhara (9), Bizet (6) (1). Nous avons étudié et titré l'affinité de chaque immunsérum vis-à-vis des globules rouges de ces différents animaux. Les courbes de titres de ces 3 sérums permettent de mettre en évidence les caractères sérologiques des différentes races en portant en abscisse les numéros des moutons rangés par race et en ordonnée le titre des 3 anticorps (courbes 1, 2 et 3).

L'examen du sérum 5 permet de mettre en évidence la fréquence variable d'un antigène suivant la race. Il est actif à un titre élevé sur 8 des 10 South-Downs et sur 4 des 20 Préalpes mais à peu près inactif vis-à-vis de tous les autres animaux. Il est donc particulièrement intéressant puisqu'il révèle un antigène existant avec une fréquence élevée chez les South-Downs. Le sérum 18, inactif sur la plupart des Préalpes, agglutine à un taux

(1) L'Institut National de la Recherche Agronomique, auquel l'un de nous (P. Millot) appartient, nous a permis d'avoir du sang de ces animaux.

voisin 9 des 10 South-Downs et à un titre variable les Bizets et les Boukhara.

Le sérum 12 présente, vis-à-vis des 57 suspensions de sang, tous les titres compris entre 0 et 128. On remarque que deux échantillons ne sont pas agglutinés et que les taux d'aggluti-



nation sont très irréguliers pour les Préalpes et pour les Bizets alors qu'ils sont assez uniformes pour les South-Downs. La moyenne des titres trouvée dans chaque race varie avec la race, les Boukhara présentant les titres les plus élevés.

L'aspect général des résultats obtenus dans les épreuves d'absorption à l'aide des globules rouges des 64 moutons précédents confirme les observations relatives au sérum de chèvre

anti-ovin. Mais de plus, le sérum met en évidence un antigène chez 4 moutons limousins.

Parmi les différentes races, on peut constater que les Préalpes ne présentent pas une homogénéité parfaite : leur pouvoir d'absorption n'est pas identique chez chaque animal. Certains de ces Préalpes présentent une parenté antigénique avec les Boukhara et les South-Downs.

L'absorption à l'aide des globules rouges de Boukhara entraîne les anticorps actifs sur les Préalpes, mais laisse persister les anticorps vis-à-vis des Mérinos de Rambouillet.

Les South-Downs absorbent l'agglutinine active contre les Mérinos, mais laissent les anticorps actifs vis-à-vis des Préalpes, des Boukhara, des Bizets et des Mérinos.

Le groupe des Mérinos de Rambouillet doit être aussi considéré comme relativement hétérogène. Mais, il faut signaler que chez ces animaux nous avons pu mettre en évidence des caractères antigéniques qui s'excluent l'un l'autre, correspondant probablement à un système allélomorphique.

CONCLUSION. — L'étude des iso-immunsérums de mouton et des hétéro-immunsérums de chèvre anti-mouton a permis de mettre en évidence des différences antigéniques entre les divers moutons examinés et de retrouver du point de vue sérologique une communauté antigénique présentant certains rapports avec la race à laquelle appartient l'animal.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CH. TODD et R. G. WHITE. *J. Hyg.*, 1910, **10**, 185.
- [2] BIALOSUENIA et KACSKOWSKI. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 1196.
- [3] BRÉBANT. *Thèse vétérinaire*, 1932, Paris.
- [4] ANDERSEN. *Zeitschr. Rassenphysiol.*, 1938, **10**, 88.
- [5] STORMONT. *Genetics*, 1951, **36**, 577.
- [6] M. YCAS. *J. Immunol.*, 1949, **61**, 327.
- [7] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, A. EYQUEM et P. MILLOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1448.
- [8] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, P. MILLOT et A. EYQUEM. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, 1714.

Voir aussi :

S. SCHERMER. *Deutsch tierartz. Wochenschr.*, 1928, n° 48, 797.

W. KAYSER. Individualitätsreaktionen des Blutes von Schafen, Ziegen Schweinen und Rindern. *Thèse*, J. Springer, éd., Berlin.

W. SCHAFER. *Zeitschr. Zuchtung*, février 1931.

ÉTUDE DES PHAGES PRODUITS PAR LE BACILLE LYSOGÈNE DE LISBONNE ET DE LEURS EXIGENCES EN CALCIUM

par J. BEUMER et M. P. BEUMER-JOCHMANS.

(Institut Pasteur de Bruxelles.)

Dans un mémoire précédent [1], confirmant le fait, reconnu par J. Bordet [2], que le phage libéré par les cultures lysogènes de bacille de Lisbonne (phage L) ne lyse pas le bacille de Shiga en bouillon oxalaté, nous avons montré qu'une concentration minimum de 0,0003 M de chlorure, de nitrate ou de gluconate de calcium est indispensable à la lyse du bacille dysentérique Y6R par le phage L. Nos expériences établissent également que c'est à la fixation du phage sur la bactérie sensible que le calcium est nécessaire, bien qu'on ne puisse exclure la possibilité que d'autres étapes de la régénération du phage exigent pareillement la présence de l'ion calcique.

On admet communément (notamment Wahl [3]) que le besoin en calcium est une propriété, non de la bactérie sensible, mais de certains phages. Nous-mêmes [4] avons constaté que le bacille Y6R, qui ne fixe pas le phage L en l'absence de calcium, fixe, par contre, un autre phage, PF, indifféremment dans un milieu additionné de calcium ou privé de cet élément par addition d'oxalate de soude. Disposant de 7 souches, sensibles au phage L à des degrés divers, nous avons voulu vérifier que la lyse de toutes ces souches par le phage L exigeait la présence de calcium. Or nous eûmes la surprise de constater que les besoins en calcium du phage L différaient selon la souche bactérienne envisagée et que l'une d'entre elles était lysée aussi bien en bouillon contenant M/125 d'oxalate de soude, qu'en bouillon simple ou additionné de calcium. Deux hypothèses étaient à envisager : ou bien le besoin en calcium dépendait selon les cas du phage ou de la bactérie sensible, ou bien le « phage L » était en réalité un mélange de deux ou de plusieurs phages. Cette seconde hypothèse retint aussitôt notre attention, car l'étalement d'un filtrat de culture lysogène de bacille de Lisbonne sur l'une des souches nouvellement étudiées, la souche Flexner 6 sensible au phage L en bouillon oxalaté, montrait de telles différences

morphologiques entre les diverses taches vierges ainsi obtenues, qu'il était hautement probable qu'elles étaient l'expression d'une hétérogénéité du filtrat lytique. L'étude du comportement, vis-à-vis des diverses souches sensibles, du phage L régénéré sur des germes différents en milieu calcique ou oxalaté, ainsi que l'isolement des taches vierges de différents types, nous avait convaincus de l'existence, dans le filtrat de culture lysogène de bacille de Lisbonne, de plusieurs phages se distinguant notamment par leurs besoins en calcium. Arrivés à ce point de nos recherches, nous eûmes connaissance du travail de Bertani [4], établissant que la souche Li de Lisbonne et Carrère, qui est probablement la même que la nôtre, libère trois phages distincts, que différencient l'aspect de leurs taches vierges et leurs caractères antigéniques. Nos propres recherches se trouvant ainsi confirmées, nous avons poursuivi l'étude des phages libérés par le bacille de Lisbonne, particulièrement du point de vue de leurs exigences en calcium.

TECHNIQUE.

1. « *Phage L* ». — Le phage que nous utilisons est un filtrat de culture en bouillon de la souche de bacille lysogène de Lisbonne et Carrère, entretenue et étudiée depuis plus de vingt-cinq ans à l'Institut Pasteur de Bruxelles.

Les lysats, obtenus en faisant agir le phage L sur divers germes sensibles, sont stérilisés par filtration sur bougie Chamberland L3, ou par addition de quelques gouttes de chloroforme ou de toluol selon les cas, les antiseptiques étant éliminés après quelques heures de contact.

2. *Souches sensibles*. — Nous avons utilisé les 7 souches sensibles suivantes : 2 souches de *B. Flexner* n^{os} 4 et 6 (qui nous avaient été remises par le regretté professeur A. Boivin), 3 souches que nous devons à l'amabilité du D^r P. Nicolle (le bacille dysentérique « Y6R », déjà utilisé précédemment, le bacille de Shiga « 4 sensible » et le *B. coli* « C36 »), 1 souche de l'Institut Pasteur de Paris, « Shiga 30 » et enfin la souche « Shiga PB » de l'Institut Pasteur de Bruxelles, utilisée par J. et P. Bordet [5].

3. *Milieux*. — Les expériences ont été effectuées en bouillon nutritif, soit simple, soit additionné, extemporanément de la quantité requise d'une solution M/10 de CaCl_2 stérilisée à part, soit encore en bouillon oxalaté. Pour préparer ce dernier milieu, on ajoute au bouillon la quantité désirée d'une solution M/5 d'oxalate de soude, on porte à l'ébullition, on filtre sur papier après refroidissement et on stérilise à l'autoclave. Le bouillon nutritif gélosé s'utilise pareillement simple, calcifié ou oxalaté. Le bouillon gélosé calcifié est préparé extemporanément par addition à la gélose nutritive fondue de la quantité voulue de solution stérile M/10 de CaCl_2 . La gélose nutritive oxalatée s'obtient en ajoutant la gélose au bouillon oxalaté préparé comme ci-dessus avant la stérilisation à l'autoclave.

4. *Titrage des phages*. — Les phages sont titrés par étalement sur

gélose nutritive selon la méthode de la double couche de Gratia [6]. Ces étalements se font soit en milieu calcique, par addition de CaCl_2 à la concentration M/1 000 à la gélose de la couche supérieure au moment de l'étalement, soit en milieu oxalaté, en utilisant pour les deux couches de la gélose nutritive oxalaté à la concentration M/125, ou M/100 préparée comme ci-dessus.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1° *Sensibilité de diverses souches bactériennes au phage L, en fonction de la teneur en calcium du milieu.* — Si l'on suit, dans des tubes contenant du bouillon de moins en moins riche en calcium, soit bouillon + M/1 000 CaCl_2 , bouillon simple, bouillon + M/125 oxalate, bouillon + M/50 oxalate, la lyse de diverses souches sensibles par le phage L, à la concentration de III gouttes de filtrat lytique pour 5 ml de bouillon, on obtient les résultats présentés sous forme abrégée dans le tableau I.

TABLEAU I.

| SOUCHES | BOUILLON + M/1.000 Ca | BOUILLON SIMPLE | BOUILLON + M/125 Ox | BOUILLON + M/50 Ox |
|---------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Flexner 6 | lyse | lyse | lyse | lyse tardive inconstante |
| Shiga 30 | lyse | lyse | lyse tardive | 0 |
| Shiga PB | lyse | lyse | 0 | 0 |
| Flexner 4 | lyse | lyse | 0 | 0 |
| Y6R | lyse | 0 | 0 | 0 |
| C 36 | lyse part. | 0 | 0 | 0 |
| Shiga 4 sensible | lyse part. | 0 | 0 | 0 |

Les souches sensibles au phage L se rangent donc en trois groupes : 1° celles dont la lyse par ce phage exige l'addition de calcium au milieu (Y6R, C36, Shiga 4 sensible), 2° celles qui sont lysées en bouillon simple sans addition de calcium et 3° deux souches, Flexner 6 et Shiga 30, sensibles au phage L même en bouillon contenant M/125 d'oxalate de soude. La quantité de calcium nécessaire à l'action lytique du phage L varie donc selon la souche sensible considérée : elle diminue de la souche Y6R qui n'est sensible au phage L qu'en bouillon additionné de calcium, à la souche Flexner 6 qui est lysée par ce phage aussi vite en bouillon contenant M/125 oxalate qu'en bouillon + calcium, mais qui ne manifeste toutefois qu'une lyse tardive et inconstante en présence d'oxalate M/50.

Comme nous l'avons signalé en débutant, ces différences s'expliquent par le fait que le filtrat de culture lysogène de bacille de Lisbonne contient plusieurs phages, dont certains peuvent lyser en absence de calcium, tandis que d'autres requièrent la présence de cet ion.

2° *Régénération du phage L sur Y6R et Flexner 6.* — Si l'on fait subir au phage L plusieurs passages sur Y6R en bouillon + calcium M/1 000 et sur Flexner 6 en bouillon additionné, soit de calcium M/1 000, soit d'oxalate M/125, on constate que le phage L originel, c'est-à-dire le filtrat de culture de bacille lysogène de Lisbonne, contient plusieurs phages, que les passages sur des germes différents, en présence soit de calcium, soit d'oxalate, permettent de sélectionner.

On introduit, dans des tubes contenant 5 ml de bouillon additionné de chlorure de calcium M/1 000 ou d'oxalate de soude M/125, III gouttes soit de phage L originel (L), soit de l'un des phages régénérés par passage sur Y6R en bouillon + calcium M/1 000 (L/Y6R,Ca), ou sur Flexner 6, d'une part en bouillon + calcium M/1 000 (L/F6,Ca), d'autre part en bouillon + oxalate M/125 (L/F6,Ox), et on ensemence soit d'Y6R, soit de Flexner 6.

On suit dans ces tubes la progression de la lyse au cours de vingt-quatre heures, au terme desquelles les tubes sont centrifugés pendant dix minutes à 6 000 tours, et on titre le phage libéré dans les liquides surnageants. Connaissant le nombre de phages introduits dans chaque tube au début de l'expérience, grâce à un titrage préalable, le titrage du phage libéré à la fin de l'expérience permet de reconnaître s'il s'est multiplié.

Dans le tableau II se trouvent rassemblés les résultats de l'expérience faite avec les phages ayant subi cinq passages sur Y6R ou sur Flexner 6 dans les conditions décrites.

On constate :

1° Qu'alors que les phages régénérés en présence de calcium, soit sur Y6R, soit sur Flexner 6, se multiplient sur Y6R en bouillon + calcium, et non en bouillon + oxalate, le phage L/F6,Ox régénéré sur Flexner 6 en bouillon + oxalate ne se multiplie plus sur Y6R, même en milieu additionné de calcium ;

2° Que si tous les phages se multiplient sur Flexner 6 aussi bien en présence d'oxalate qu'en présence de calcium, les phages qui se reproduisent dans les deux cas diffèrent au point de vue de l'aspect des taches qu'ils produisent par étalement sur le germe sensible.

On reconnaît en effet nettement deux types de taches lorsque l'on étale du phage L originel sur Flexner 6, sur gélose calcifiée :

TABLEAU II.

| PHAGES | SERMES | BOUILLON + | LYSE | MULTIPLI- CATION | TYPE DES TACHES |
|----------|--------|--------------------|--------|---------------------|--------------------|
| L | Y6R | Calcium Oxalate | T O | + O | G et P |
| | Flex.6 | Calcium Oxalate | T T | + + | H+ et H- H- |
| L/Y6R Ca | Y6R | Calcium Oxalate | T O | + O | G et P |
| | Flex.6 | Calcium Oxalate | T P | + + | H+ et H- H- |
| L/F6 Ca | Y6R | Calcium Oxalate | T O | + O | G et P |
| | Flex.6 | Calcium Oxalate | T ? | + + | H+ et H- H- |
| L/F6 Ox | Y6R | Calcium Oxalate | O O | O O | |
| | Flex.6 | Calcium Oxalate | O O | + + | H- H- |

à côté de grandes taches, à fond complètement lysé et entourées d'un halo, que nous désignons par H+ (halo), on remarque un nombre bien plus élevé de taches de taille assez variable, mais plutôt petite, que nous appelons H—, parce que dépourvues de halo. Plus tard nous avons différencié ce qui paraît être un troisième type, que nous avons appelé V : ce sont des taches, plus petites que les H+, mais plus grandes que les H— ; les bords en sont très nets, sans halo et, contrairement aux H—, leur fond est complètement lysé (fig. 1). On reconnaît sans peine dans notre type H+, le phage P2 de Bertani [4] ; il est plus difficile d'assimiler nos types H— et V, à ses phages P1 et P3.

L'étalement du phage L originel sur Y6R sur gélose calcifiée donne également un mélange de taches d'une grande hétérogénéité morphologique, mais il est plus difficile de les classer en types. Nous avons pu néanmoins y reconnaître de grandes taches, parfois entourées d'un halo discret, que nous désignons par G (grandes) et qui se différencient assez aisément des autres taches de taille plus petite, bien qu'assez irrégulière, et que nous qualifions de P (petites).

Or on constate que si, en bouillon calcifié, les deux types H+ et H— se multiplient sur Flexner 6, le type H+ ne se reproduit pas en bouillon oxalaté. Le phage L/F6,Ox régénéré par passages sur Flexner 6 en bouillon oxalaté ne donne plus de taches du type H+, même lorsqu'on le reporte sur Flexner 6 en bouillon + calcium.

Il semble donc que le filtrat de culture de bacille lysogène de

Lisbonne (phage L) contient en réalité plusieurs phages, comme le démontrent, d'une part l'hétérogénéité morphologique des taches produites par ce phage complexe, et d'autre part la sélection qu'opèrent parmi ces types de taches les passages en bouillon oxalaté : en effet, tandis que l'un de ces types (H—) peut se multiplier en présence d'oxalate, le type H+ ne se reproduit qu'en milieu calcifié. Le Flexner 6 paraît sensible à ces deux types en milieu calcifié, mais au type H— seul en milieu oxalaté. Le cas de l'Y6R est plus complexe : il semble être insensible au type H—, mais on s'explique mal dans ces

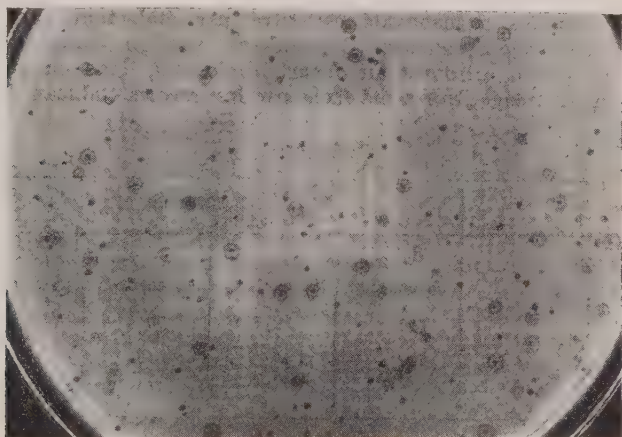


FIG. 1. — Phage L étalé sur Flexner 6, sur gélose + calcium. (Gross. : 1/1). Taches H+, grandes, entourées d'un halo; taches H—, petites, fond incomplètement lysé; taches V, moyennes, bords nets, fond complètement lysé.

conditions que le phage L/Y6R,Ca, régénéré sur Y6R en calcium, contienne encore du phage du type H—.

Si l'on compare enfin l'action lytique de ces divers phages, on constate que la propriété, que possède le phage L originel de lyser Flexner 6 en bouillon oxalaté, tend à disparaître au cours des passages successifs sur Flexner 6, soit en bouillon calcifié, soit en bouillon oxalaté, et ceci malgré la multiplication du type H—, capable de se reproduire même en présence d'oxalate. La raison de cette différence entre le phage L originel et les phages régénérés par passages sur le germe sensible n'est pas claire.

3° *Fixation du phage L originel sur Y6R et Flexner 6.* — L'hétérogénéité du phage L originel et le comportement différent

des types H+ et H— en présence de calcium ou d'oxalate peuvent être mis en évidence de façon particulièrement nette en étudiant la fixation du phage L originel sur Y6R et sur Flexner 6, en bouillon calcifié ou oxalaté.

A des suspensions épaisses d'Y6R ou de Flexner 6, en bouillon + calcium M/2 000 d'une part, en bouillon + oxalate M/50, d'autre part, on ajoute une quantité appropriée de filtrat de culture de bacille lysogène de Lisbonne (phage L originel) et on porte au bain-marie à 37° pendant vingt minutes, pour permettre la fixation du phage. Au sortir du bain-marie les tubes sont refroidis dans la glace, puis centrifugés pendant dix minutes à 6 000 tours ; le phage resté libre dans les liquides surnageants est titré par étalement sur Y6R et Flexner 6 sur gélose calcifiée. Connaissant, par un titrage préalable, le titre du phage introduit au départ, on estime dans chaque cas la proportion du phage, qui a été fixée par les germes (tableau III).

TABLEAU III.

| Titré sur | PHAGE FIXE POUR 100 | | | |
|-------------------|---------------------|------------|---------------|------------|
| | par Y6R | | par Flexner 6 | |
| | en calcium | en oxalate | en calcium | en oxalate |
| Y6R | 91 | 22,5 | 50 | 38,5 |
| Flexner 6 type H+ | 100 | 0 | 70,6 | 0 |
| type H— | 73,7 | 66,7 | 96,9 | 97,4 |

Le bacille Y6R fixe en présence de calcium les 9/10 des particules actives sur lui-même, alors qu'en milieu oxalaté il n'en fixe qu'une proportion très faible (1/5 environ). Il absorbe de même en présence de calcium la totalité des particules H+ actives sur Flexner 6, mais n'en fixe aucune en milieu oxalaté. Le bacille Y6R enfin fixe moins bien les particules H—, mais la proportion de celles-ci, qu'il absorbe en présence d'oxalate, diffère peu de celle qu'il absorbe en milieu additionné de calcium. Le Flexner 6 fixe assez mal les particules actives sur Y6R, surtout en présence d'oxalate. Il fixe mieux les particules H+, du moins en milieu calcifié, car il n'en fixe aucune en milieu oxalaté ; il fixe, par contre, la majorité des particules H—, aussi bien en présence d'oxalate que de calcium.

Cette expérience démontre : 1° que les particules actives sur Y6R nécessitent, pour la plus grande part, la présence de calcium pour se fixer sur le germe sensible, que les particules H+ ne se fixent pas du tout en présence d'oxalate, et enfin que les particules H— se fixent aussi bien en milieu oxalaté qu'en milieu additionné de calcium ; 2° que les germes étudiés sont différem-

ment sensibles aux divers types de phages : Y6R est très sensible au type H+, mais l'est assez peu au type H—, Flexner 6, par contre, est plus sensible au type H— qu'au type H+ ou aux particules actives sur Y6R.

Dans le phage L originel la majorité des particules actives sur Y6R ne se fixe sur Y6R ou sur Flexner 6 qu'en présence de calcium, et les particules H+ se comportent de même, mais les particules H—, par contre, se fixent indifféremment en présence de calcium ou d'oxalate, tout en faisant montre d'une affinité réduite pour Y6R.

4° Isolement des phages contenus dans le phage L originel. —

L'étalement sur gélose calcifiée d'un filtrat ou d'un liquide surnageant de culture en bouillon de bacille lysogène de Lisbonne donne sur Y6R et sur Flexner 6 un mélange de taches morphologiquement différentes, que l'on peut ranger en quelques types décrits au 2° de ce mémoire. Nous nous sommes efforcés d'isoler les phages qui produisent ces divers types de taches.

On étale sur gélose calcifiée le liquide surnageant d'une culture de bacille de Lisbonne, sur Y6R d'une part, sur Flexner 6 d'autre part. Après développement, on isole de l'étalement sur Y6R une tache G et une tache P, et de l'étalement sur Flexner 6 une tache des types H+, H— et V. Les phages ainsi isolés sont régénérés sur le germe sensible dont ils proviennent et étalés à nouveau sur ce germe ; isolés une seconde fois, ils sont régénérés sur le germe sensible correspondant.

Les phages ainsi isolés deux fois sont étalés sur Y6R et sur Flexner 6, sur gélose calcifiée et sur gélose oxalatée ; les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV.

Les phages isolés des taches H+ sur Flexner 6, d'une part, et des taches G sur Y6R, d'autre part, se comportent de même : tous deux, en effet, ne donnent de taches sur ces deux germes que sur gélose calcifiée, et produisent sur Y6R des taches G et P et sur Flexner 6 des taches H+ et H—. Il y a donc tout lieu de croire que ces phages sont identiques : le type H+ sur Flexner 6 correspond au type G sur Y6R. Mais, malgré des isolements répétés, nous avons toujours constaté que le type H+ donne un mélange de taches H+ et H—, comme le type G produit à la fois des taches G et P, du moins par étalement sur gélose calcifiée, car sur gélose oxalatée les types H+ et G ne produisent pas de taches. Tout se passe comme si le type H+ = G donnait continuellement des taches H— ou P par mutation. Ces mutants n'apparaissent que sur la gélose calcifiée, probablement parce que le type H+ = G ne se reproduit qu'en milieu calcifié

TABLEAU IV.

| Phages | Étalés sur Y6R | | Étalés sur Flexner 6 | |
|---|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| | sur gélose + Ca | sur gélose + Ox | sur gélose + Ca | sur gélose + Ox |
| H+ | G +++ P +++ | O | H+ ++ H- + | O |
| H- | P O à ± ? | O | H- ++ | H- +++ |
| V | P O à ++ ? | O | V +++ H- +++ | V ++++ H- ++++ |
| G | G +++ P +++ | O | H+ ++ H- + | O |
| P | P ++++ | O | V +++ H- +++ | V +++ H- +++ |
| N.B.- Nombre de taches : ± : < 100 + : > 100 ++ : > 1.000 +++ : > 10.000 ++++ : > 100.000 | | | | |

et que c'est au cours de la reproduction du phage que les mutants sont produits.

Les types H— et V se distinguent nettement du type H+ = G, en ce que étalés sur Flexner 6 ils donnent des taches sur gélose oxalatée aussi bien que sur gélose calcifiée ; étalés sur Y6R, ils donnent de façon inconstante des taches du type P sur gélose calcifiée et n'en donnent pas sur gélose oxalatée. Les deux types H— et V ne donnent jamais de taches du type H+ ou G, mais il est, par contre, assez difficile de les distinguer l'un de l'autre et de les séparer : le type V isolé donne régulièrement un mélange de taches H— et V et il n'est pas aisé d'obtenir le type H— à l'état pur.

Le type P, très actif sur Y6R et sur Flexner 6, donne uniquement des taches P sur Y6R et seulement sur gélose calcifiée. Par contre, il agit sur Flexner 6 aussi bien sur gélose oxalatée que sur gélose calcifiée, en donnant dans les deux cas un mélange de taches H— et V.

En résumé, on individualise nettement deux groupes de phages :

1° Un phage, qui agit uniquement en présence de calcium, donnant des taches de type G sur Y6R et de type H+ sur

Flexner 6 : ce phage semble donner continuellement des mutants de types H — ou P ;

2° Un groupe de phages actifs sur Flexner 6 aussi bien sur gélose oxalatée que sur gélose calcifiée et auquel appartiennent les types H —, V et P. Les rapports entre ces trois types sont assez mal définis : H — et V sont nettement plus actifs sur Flexner 6 que sur Y6R, qu'ils n'attaquent qu'irrégulièrement ; d'autre part, le phage P, qui donne des taches P sur Y6R et des taches H — et V sur Flexner 6, est cependant difficilement assimilable à l'un de ces deux types, puisqu'il est régulièrement très actif sur Y6R. Il faut noter enfin que le phage P n'agit sur Y6R que sur gélose + calcium, alors qu'étalé sur Flexner 6 il donne des taches sur gélose oxalatée.

Nous avons effectué quelques tentatives de séparation des différents types de phages que contient le phage L originel, par ultrafiltration sur membranes Gradocol et par ultracentrifugation. Ces expériences, sans permettre une séparation absolue des différents types de particules, montrent toutefois que leurs tailles sont différentes.

C'est ainsi qu'à l'ultrafiltration du phage L originel, les membranes Gradocol de porosité moyenne de 83 m μ arrêtent toutes les particules, tandis que les membranes de 110 m μ laissent passer 30 p. 100 des particules H+, 10 p. 100 des particules V et 0,05 p. 100 seulement des particules H —. Ces dernières sont donc nettement plus volumineuses que les particules du type H+, et plus grosses également que celles du type V, ce qui tendrait à confirmer que le type H — est distinct du type V. L'ultracentrifugation du phage L originel démontre aussi que les particules H — sont plus volumineuses que les H+ et les V : après trente minutes d'ultracentrifugation à 20 000 tours/minute, le liquide surnageant s'appauvrit davantage en particules H — qu'en H+ ou en V.

Signalons, en terminant, que nous nous sommes demandé si tous les individus d'une culture de bacille lysogène de Lisbonne sont susceptibles de libérer les différents types de phages, ou bien si la population bactérienne est constituée d'un mélange de races capables chacune de produire seulement l'un de ces types. J. et P. Bordet [5] ont montré que le bacille de Lisbonne donne aisément naissance à de nombreux mutants : nous avons pu, en effet, isoler d'une culture plusieurs colonies d'aspect différent et nous avons recherché quels types de phages produisaient les cultures obtenues à partir de ces colonies isolées. Ainsi que l'a noté, par ailleurs, Bertani [4], on ne constate aucune différence entre ces diverses cultures : toutes donnent par étalement sur Flexner 6 les trois types de taches habituels.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Le filtrat lytique de culture en bouillon de bacille lysogène de Lisbonne fait montre d'exigences en calcium, qui diffèrent selon le germe sensible sur lequel on le fait agir. C'est ainsi que sur 7 souches étudiées, 3 ne sont lysées que si l'on ajoute du calcium au bouillon, 2 le sont en bouillon simple, et 2 enfin sont lysées même en bouillon contenant M/125 d'oxalate. Les besoins en calcium du phage L dépendent-ils du germe sur lequel il agit, ou bien le « phage L » est-il un mélange de phages, dont certains nécessitent la présence de calcium pour agir, tandis que d'autres peuvent s'en passer, quel que soit le germe envisagé ?

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi deux germes dont le comportement vis-à-vis du phage L s'est révélé nettement différent : l'un (Y6R) n'est lysé qu'en bouillon additionné de calcium, tandis que l'addition de M/125 d'oxalate au bouillon n'empêche pas la lyse de l'autre (Flexner 6). Or, la diversité des taches vierges que le phage L originel produit sur ces deux germes, la constatation que certaines d'entre elles ne se manifestent pas sur gélose oxalatée et disparaissent au cours des passages successifs du phage L sur Flexner 6 en bouillon + oxalate, enfin l'isolement de ces divers types de taches nous ont permis de reconnaître l'existence de plusieurs phages distincts dans le phage L originel.

C'est ainsi que sur Flexner 6 le phage L produit trois types de taches (H+, H— et V) et au moins deux types sur Y6R (G et P) : le type H+ ressemble au phage P2 de Bertani [4], mais le simple examen morphologique ne nous a pas permis d'assimiler nos types H— et V aux phages P1 et P3 de cet auteur.

Le type H+ isolé sur Flexner 6 est identique au type G isolé sur Y6R : le phage qui donne des taches de ce type agit sur Y6R et sur Flexner 6 en présence de calcium uniquement. Mais le phage H+ = G fournit régulièrement des mutants du type H— : ces mutants n'apparaissent qu'en milieu calcifié, probablement parce qu'ils ne se produisent, comme il est normal, qu'au cours de la reproduction du phage H+ = G, qui exige la présence de calcium. C'est cette production de mutants H— qui explique que le phage régénéré plusieurs fois sur Y6R en bouillon + calcium contient encore des particules actives sur Flexner 6 en bouillon + oxalate.

Les phages qui donnent les taches H— et V sur Flexner 6 agissent sur ce germe en bouillon oxalaté aussi bien qu'en présence de calcium. C'est donc à ces phages qu'il faut attribuer l'activité du phage L originel sur Flexner 6 en bouillon oxalaté. Par contre, sur Y6R, leur activité est faible et irrégulière, même

en milieu calcifié : ceci expliquerait l'absence d'activité du phage L originel sur Y6R en milieu oxalaté, par le manque de sensibilité de ce germe aux phages qui n'exigent pas le calcium.

Quant aux taches P, que produit sur Y6R le phage L originel, elles livrent à l'isolement un phage très actif sur Y6R (P), mais en bouillon + calcium seulement, alors que, très actif sur Flexner 6 également, il donne sur ce germe des taches de types H— et V, aussi bien en présence d'oxalate que de calcium.

On ne peut exclure *a priori* la possibilité que le phage des taches P serait lui-même complexe et renfermerait à côté d'un phage capable d'agir en milieu oxalaté sur Flexner 6, et auquel Y6R est très peu sensible, un autre phage exigeant le calcium et qui serait celui qui produit les taches sur Y6R. Mais à défaut de pouvoir isoler ce phage hypothétique, on peut aussi supposer que dans ce cas le calcium est nécessaire à l'activité du phage P sur certaines bactéries seulement, d'autres étant sensibles à ce même phage en l'absence de cet ion. Il se peut donc que l'absence d'activité du phage L originel sur Y6R en milieu oxalaté ne soit pas due exclusivement au peu de sensibilité de ce germe aux phages capables d'agir en présence d'oxalate, mais également à ce que l'Y6R serait insensible en milieu oxalaté à un phage (P), auquel il est sensible en présence de calcium, et qui agit pourtant en présence d'oxalate sur une autre bactérie.

Au cours des passages répétés sur Flexner 6 en bouillon + oxalate, le type H+, que contient le phage L, incapable de se reproduire dans ces conditions, disparaît, et seuls persistent les types H— et V ; par contre, au cours des passages sur Y6R et sur Flexner 6 en bouillon additionné de calcium, tous les types que nous avons reconnus semblent se reproduire. Ceci explique donc pourquoi le phage régénéré sur Flexner 6 en bouillon oxalaté se comporte différemment du phage L originel et du phage régénéré en présence de calcium.

Enfin, les expériences de fixation ont confirmé que c'est surtout à ce premier stade de l'attaque du germe par le phage H+ que le calcium est nécessaire : en effet, ce phage ne se fixe sur Y6R ou Flexner 6 qu'en présence de calcium, tandis que le phage H— se fixe sur Flexner 6 aussi bien en présence d'oxalate que de calcium. Ces expériences ont montré aussi que le bacille Y6R fixe beaucoup moins bien le phage H— que ne le fait le Flexner 6, confirmant ainsi la faible sensibilité d'Y6R au phage H—.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BEUMER et M. P. BEUMER-JOCHMANS. Ces *Annales*, 1951, **81**, 489.
- [2] J. BORDET. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 403.
- [3] R. WAHL. Ces *Annales*, 1946, **72**, 73.
- [4] G. BERTANI. *J. Bact.*, 1951, **62**, 293.
- [5] J. et P. BORDET. Ces *Annales*, 1946, **72**, 161 et 321.
- [6] A. GRATIA. Ces *Annales*, 1936, **57**, 652.

ÉTUDE HISTOPATHOLOGIQUE DES TROUBLES DE LA NUTRITION CHEZ LE NOURRISSON ET L'ENFANT VIETNAMIEU

par J. BABLET et J. CANET

(avec le concours technique de M^{me} O. KVIATKOVSKY).

(Institut Pasteur de Paris et Service Médical des Terres Rouges.)

Au lendemain des grandes victoires pasteuriennes, bon nombre de maladies se trouvèrent pourvues d'un agent causal spécifique, bactérie ou virus, rickettsie ou spirochète, protozoaire ou champignon. Cependant, on s'aperçut très vite que, chez les autochtones, un groupe étendu de manifestations pathologiques ne rentrait pas dans ce cadre : la découverte de la vitamine anti-béribérique (Eijkman, 1912) et les investigations qui s'ensuivirent montrèrent le rôle considérable des *maladies de la nutrition* parmi la population des territoires d'outre-mer. Des études expérimentales très poussées précisèrent, notamment au cours des trente dernières années, l'importance de l'alimentation dans la pathologie tropicale et plus particulièrement celle de certains éléments impondérables jusque-là mal connus ou ignorés. La quantité de calories fournie par les aliments cessa d'être le critérium essentiel, pour ne pas dire unique, des besoins de l'organisme : un facteur qualitatif se révéla indispensable sous forme d'un apport de vitamines provenant quotidiennement de la ration alimentaire.

Cette notion de carence vitaminique permettait d'expliquer en grande partie les taux généralement élevés de morbidité et de mortalité infantiles dans les zones tropicales ; il devint évident que ce facteur qualitatif, tout en agissant dès la naissance, voire même dès la vie intra-utérine, se manifestait avec une intensité accrue à l'époque du sevrage : celui-ci constitue en effet trop souvent, pour le nourrisson africain ou asiatique, une période extrêmement critique au cours de laquelle, privé plus ou moins brutalement du lait maternel, il est soumis à un régime déséquilibré ou exclusif à base de glucides qui ne correspond nullement à ses besoins réels. Par une série d'enquêtes récentes, des organismes internationaux ont recueilli dans ce domaine une

importante documentation et s'efforcent de remédier aux multiples déficiences qu'elle révèle. Il ne saurait évidemment être question d'imposer à travers le monde, à des pays très divers à tous égards, une ration standard adéquate, mais bien de mettre de l'ordre dans l'écheveau passablement complexe des carences alimentaires au cours desquelles intervient généralement, à côté d'une ou plusieurs avitaminoses, l'absence d'un certain nombre de facteurs non moins importants tels que les sels minéraux, les aminoacides, les protéines animales. En effet, si quelques formes typiques nettement caractérisées d'avitaminoses ont pu être dégagées et reproduites expérimentalement, il faut cependant tenir compte de la multiplicité des combinaisons possibles où s'affrontent les agents favorisants ou antagonistes : ceux-ci engendrent un extraordinaire polymorphisme séméiologique qui complique singulièrement le diagnostic clinique et voue à l'échec la plupart des tentatives thérapeutiques.

L'anatomie pathologique est susceptible de fournir ici d'utiles précisions sur les organes lésés et sur les modalités réactionnelles dont ils sont le siège. Il semble qu'elle soit d'autant plus démonstrative qu'elle s'adresse à des organismes jeunes, à des nourrissons ou à des enfants en bas-âge. Les travaux de Davies (Ouganda, 1948), de Waterlow et Hartz (Antilles, 1949), de Magalhaes Carvalho (Brésil, 1947), plaident en ce sens. De nombreuses observations de « kwashiorkor » africain indiquent également qu'en Afrique occidentale (Bergeret), au Maroc (J. Delon), en Gold Coast (C. Williams), le jeune enfant noir présente de très bonne heure des troubles nutritionnels caractéristiques que l'on retrouve avec certaines variantes en Asie chez les « bouffis d'Annam », dont les lésions ont été étudiées en 1937 par Normet et Bablet.

De notre côté, nous avons apporté récemment une modeste contribution à l'histopathologie des troubles de la nutrition qui surviennent chez le jeune vietnamien : l'un de nous (Canet, 1952) a exposé les données générales du problème extrêmement complexe des déficiences alimentaires en milieu infantile indo-chinois, en soulignant la haute gravité de leurs répercussions sociales et la très grande fréquence de la *stéatose hépatique* non seulement chez le nourrisson et l'enfant de 2 à 5 ans, mais encore chez le fœtus, dès la vie intra-utérine. Mettant à profit la surveillance sanitaire permanente d'un nombreux personnel indigène sur les Plantations d'hévéas des Terres-Rouges, nous avons pu examiner des centaines d'enfants plus ou moins sérieusement atteints, mettre en observation les plus suspects, pratiquer des ponctions-biopsies du foie et des nécropsies dans les meilleures conditions techniques. Une bonne fixation des organes prélevés peu de temps après la mort nous autorise à faire état

des résultats histopathologiques, dont la valeur est par ailleurs confirmée par des examens de pièces provenant de sujets témoins. Au total, cette étude a porté sur 86 examens, soit sur 27 biopsies du foie et 59 autopsies, se rapportant à 7 prématurés, 4 mort-nés à terme (victimes d'accidents obstétricaux), 36 nourrissons de moins de 1 an, 13 enfants de 1 à 3 ans, 11 enfants de 3 à 16 ans et 15 adultes.

Les ponctions-biopsies du foie ont été faites sans incidents et les échantillons de tissu hépatique fixés au liquide de Hollande. Les organes provenant des autopsies ont été fixés au Bouin : il s'agissait de fragments de foie, de pancréas, de rate, de rein, de surrénales, exceptionnellement de myocarde, de glandes salivaires, de poumon ou de ganglion suspects. Comme coloration, nous avons adopté les trichromiques de P. Masson, l'hématoxyline de Mallory, la méthode de Mann, l'imprégnation argentique par la technique de Perdreau-Bielchowsky, la coloration des graisses par le scharlach sur coupes à congélation, le mucicarmin...

En raison des facilités qu'il offre à l'exploration clinique (volume, sensibilité, tests d'insuffisance hépatique, ponctions-biopsies en vue de l'examen histologique, etc.), le foie a d'emblée retenu l'attention des biologistes qui ont étudié les troubles nutritionnels de l'enfance. L'augmentation de volume de cet organe, sans être absolument constante, se produit cependant dans 60 à 80 p. 100 des cas et nous trouvons couramment 40 à 50 p. 100 de porteurs de gros foie parmi la population infantile en apparence bien portante des villages vietnamiens. Cette hépatomégalie est toutefois relativement discrète : elle s'accompagne de *stéatose généralisée* en fines et moyennes gouttelettes, qui diffère des dégénérescences graisseuses massives à larges vacuoles des grandes intoxications et de la tuberculose hépatique. Elle rappelle, au contraire, la stéatose de la fièvre jaune. La stase veineuse est évidente, mais ne s'accompagne pas d'ectasie des sinusoides comme dans le foie cardiaque. Par ailleurs, on n'observe ni dissociation trabéculaire, ni nécrose cellulaire du type atrophique, non plus que de cholestase. L'infiltration lymphocytaire est diffuse et toujours discrète dans le lobule, plus accusée parfois dans les espaces portes où les canaux biliaires sont généralement intacts. On note, d'autre part, un certain degré de sclérose vasculaire chez les enfants les plus âgés, sans pénétration dans le lobule des fibrilles conjonctives. Le réseau de réticuline est normal et bien dessiné. Le caractère réversible des lésions est indiqué par la rareté des pycnoses nucléaires et la fréquence de l'hyperplasie des noyaux, indice d'une restauration possible des tissus, ce qui correspond parfaitement à l'évolution clinique lorsque l'enfant cesse d'être soumis

à une ration carencée, ainsi que nous l'avons souligné dans la note citée plus haut.

En résumé, la surcharge graisseuse des cellules hépatiques s'observe dans tous les cas du syndrome que nous avons appelé « de la mort en cours de route », qui est essentiellement caractérisé par l'apparition brutale, chez des nourrissons vietnamiens presque toujours âgés de 1 à 3 mois (période de sevrage), de convulsions généralisées et de phénomènes de choc auxquels la mort succède en quelques instants. Cette surcharge a pu être mise en évidence également chez des prématurés de 7 à 8 mois ainsi que chez des enfants nés à terme mais décédés à la suite d'accidents obstétricaux, ce qui révèle l'influence considérable du régime alimentaire de la mère sur la constitution du fœtus.

En dehors du foie, l'organe qui présente le plus souvent des altérations caractéristiques au cours des affections carentielles de l'enfant vietnamien est le *pancréas*. De telles lésions ont été signalées précédemment par Carvalho au Brésil (1945), par Davies en Ouganda (1948), par Veghelyi en Europe centrale (1948), par Waterlow puis par Hartz aux Antilles (1949). Ce dernier auteur en donne des photographies particulièrement démonstratives. Dans une thèse présentée en 1951, Nezelof étudie les atrophies pancréatiques chez l'enfant et met en garde contre la nécrose cadavérique rapide du pancréas et son auto-digestion. Cependant, même en écartant les résultats d'autopsies relativement tardives, l'atteinte du pancréas paraît constante : nous l'avons rencontrée chez la très grande majorité de nos cas indo-chinois, alors que toutes les précautions d'ordre technique étaient prises, ainsi que nous l'avons dit plus haut. Elle se trouve d'ailleurs confirmée par l'expérimentation chez les rats soumis à des régimes volontairement déséquilibrés (Friedman, Veghelyi).

Dans le syndrome « de la mort en cours de route » nous avons retrouvé ces lésions pancréatiques d'une façon quasi permanente mais sous des formes différentes : sclérose interlobulaire et raréfaction des acini, nécrose granuleuse partielle de la glande à sécrétion externe, avec intégrité des îlots de Langerhans. Nous n'avons pas observé la dégénérescence fibrokystique du pancréas, mais, dans quelques cas, la nécrose partielle des acini voisinait avec des plages d'hyperplasie nucléaire plus ou moins étendues.

Les lésions pancréatiques précèdent-elles ou suivent-elles la stéatose hépatique ? Hartz estime que, dans l'ordre chronologique, la défaillance pancréatique précède et commande celle du foie : nous partageons entièrement cette opinion, ayant constaté à maintes reprises, chez le très jeune enfant, que la dégénérescence graisseuse du foie était moins avancée que

la nécrose granuleuse des acini pancréatiques. Quoi qu'il en soit, les deux processus sont étroitement associés et subordonnés à la carence des facteurs lipotropes : méthylpurine, méthionine, choline, régimes riches en protides.

Notre intention, dans le présent travail, est d'insister sur un point qui paraît être resté jusqu'ici secondaire lors des recherches effectuées dans de nombreux pays sur les troubles nutritionnels de l'enfance. En effet, la constance et l'importance des lésions du foie et du pancréas au cours de ces affections semblent avoir détourné l'attention des altérations observées à l'examen histologique sur les autres organes, altérations qui sont cependant loin d'être négligeables, ainsi qu'on va pouvoir en juger par ce qui suit.

Au niveau *du rein*, l'échelle de gravité, assez étendue, va des lésions irritatives banales à la néphrite glomérulo-épithéliale caractérisée. Un certain parallélisme a été noté dans quelques cas entre les lésions du foie, du pancréas et des reins, qui conservent cependant leur autonomie évolutive. Ce sont les glomérules qui sont les premiers atteints : dilatation du bouquet vasculaire, œdème, sclérose, autant de stades successifs qui précèdent la nécrose. La dilatation des tubes contournés, leur desquamation et la formation de cylindres hyalins, la dégénérescence granuleuse des épithéliums suivent de près, mais demeurent en général segmentaires. La sclérose interstitielle est exceptionnelle, le réseau de réticuline est bien dessiné et sans bavures, l'infiltration lymphocytaire reste diffuse et discrète.

Nous arrivons maintenant aux lésions très importantes des glandes *surrénales*. Celles-ci sont volumineuses et, en général, très touchées : la corticale, dissociée, présente une abondante surcharge lipidique, surtout au niveau de la couche fasciculée ; la congestion et la sclérose de la médullaire sont manifestes, le réseau de réticuline est intact. Ces altérations de la surrénale prouvent que la malnutrition peut agir exactement de la même façon que les intoxications aiguës et entraîner en quelques semaines des modifications tissulaires suffisamment étendues et graves pour déclencher un authentique syndrome de choc rapidement mortel ; mais encore convient-il, comme nous allons le voir, de ne pas exagérer leur rôle.

Les faits qui précèdent s'inscrivent incontestablement dans la série des phénomènes décrits par H. Selye en 1946 et, bien avant lui, en France par J. Reilly, ainsi que l'a récemment démontré Ph. Decourt, de qui certaines critiques pertinentes semblent être confirmées par nos propres constatations. A ce propos, sans vouloir nous étendre, dans le présent travail, plus spécialement consacré à l'anatomie pathologique, sur les rapports étroits du syndrome indochinois avec les phénomènes de Reilly, il nous

paraît cependant utile d'insister sur les points suivants :

1° Dès 1934, Reilly et ses collaborateurs ont montré que des agents d'agression très divers (physiques, chimiques, physiologiques, etc.) et portant soit directement, soit indirectement sur le système nerveux végétatif, peuvent provoquer dans l'organisme un type de réactions non spécifiques se traduisant par des lésions parfaitement superposables, quelle que soit la nature de l'agent causal : ces réactions non spécifiques comportent, suivant le degré de gravité : la vasodilatation, un gonflement des endothéliums vasculaires, une augmentation de la perméabilité capillaire, de l'œdème, souvent un afflux leucocytaire, puis des petites ruptures vasculaires hémorragiques siégeant au niveau des vaisseaux périphériques, des nécroses, enfin un processus plus ou moins étendu et tardif de sclérose. En outre, ces réactions histophysiologiques s'accompagnent de la série classique des symptômes de choc.

Ce sont précisément là, d'une façon générale, les manifestations humorales, fonctionnelles et viscérales complexes que nous avons observées au double point de vue clinique et anatomopathologique chez les jeunes enfants vietnamiens carencés et dont la cause initiale paraît provenir essentiellement de la conjugaison de deux facteurs d'ordre nutritionnel : l'insuffisance des protéines animales et l'augmentation anormale de la ration glucidique.

2° Les phénomènes ainsi constatés chez ces enfants sont incontestablement d'authentiques phénomènes de Reilly. Ils correspondent donc également au « syndrome d'adaptation » de Selye, mais ils nous paraissent justifier l'opinion de Ph. Decourt (*La Presse Médicale*, 9 juillet 1952, n° 47) suivant laquelle « contrairement à l'affirmation de Selye, l'évolution de la résistance spécifique aux agressions ne se fait pas suivant un type unique, mais suivant des types multiples et différents de celui qui est considéré par cet auteur comme constant et universel ». En effet, nous ne retrouvons pas chez les enfants atteints du « syndrome de la mort en cours de route », les trois stades distincts (alarme, résistance et épuisement) qui caractérisent pour Selye, dans tous les cas, le syndrome général d'adaptation : les phénomènes de choc, ainsi que nous l'avons souligné à plusieurs reprises dans notre premier travail, surviennent presque toujours brutalement chez un enfant en bonne santé apparente et, en l'absence de traitement, entraînent à peu près inévitablement la mort en un temps très court (une demi-heure à quelques heures) ; on chercherait vainement dans cette évolution suraiguë, le schéma type en trois phases décrit par Selye.

3° Enfin, dans l'état actuel de nos recherches, nous sommes également conduits à critiquer avec Ph. Decourt le rôle exclusif que Selye fait jouer à la cortico-surrénale dans ces accidents. S'il

nous paraît indiscutable que les altérations des surrénales interviennent pour une large part dans les manifestations de choc terminal, par contre il nous semble difficile d'en faire la cause essentielle et primordiale de toutes les réactions organiques enregistrées chez les nourrissons vietnamiens. Bien que l'Ecole de l'hôpital Claude-Bernard n'ait pas encore établi définitivement par quel processus l'atteinte initiale des fibres nerveuses végétatives provoque les réactions non spécifiques des cellules périphériques, et qu'elle invoque plusieurs mécanismes simultanés (libération de médiateurs chimiques ou de produits organiques toxiques, action trophique directe et réactions endocriniennes secondaires), nous admettons cependant avec R.-A. Marquézy et M. Ladet que les phénomènes de Reilly, auxquels nous assimilons ceux que nous rapportons ici, « relèvent d'une atteinte de toutes les fonctions du système neuro-végétatif étroitement lié au système endocrine ». Certes, les altérations des surrénales des enfants indochinois carencés, telles que les font ressortir les documents photographiques ci-joints, sont considérables, mais elles sont loin d'être uniques ; elles sont accompagnées ou précédées par des lésions tissulaires extrêmement graves des autres glandes endocrines, pancréas et foie, ainsi que nous l'avons vu plus haut. A cet égard, plusieurs de nos observations sont d'un grand intérêt, qui révèlent la coexistence d'altérations nettes mais relativement modestes des surrénales avec des lésions très avancées du foie et surtout du pancréas. Dans ces conditions, il serait abusif de vouloir attribuer à la cortico-surrénale la responsabilité de l'ensemble des manifestations du syndrome malin d'origine nutritionnelle. Il est vraisemblable qu'une étude approfondie des phénomènes réactionnels survenant chez les jeunes indochinois apporterait des renseignements d'une grande valeur en ce qui concerne le rôle exact de la surrénale dans leur genèse.

Les autres organes ne présentent par contre, en général, que des lésions légères et peu caractéristiques : c'est ainsi que la *rate* offre le plus souvent des signes d'hypoplasie et de raréfaction cellulaire consécutifs à l'effacement des follicules lymphoïdes et de leurs centres germinatifs. On y constate l'absence de pigment mélanique d'imprégnation palustre, ce qui est normal chez des sujets sérieusement protégés contre l'endémie malarienne. On note en outre, fréquemment un renforcement de la capsule et un certain degré de sclérose vasculaire.

Les glandes salivaires (parotide, sous-maxillaire) nous ont toujours paru sensiblement normales. *Les poumons*, souvent engorgés et dont la trame présente une infiltration réactionnelle d'étendue et d'importance variables, peuvent être le siège d'infections secondaires favorisées par la moindre résistance de l'enfant carencé. Il en est de même des diverses portions de *l'intestin* où

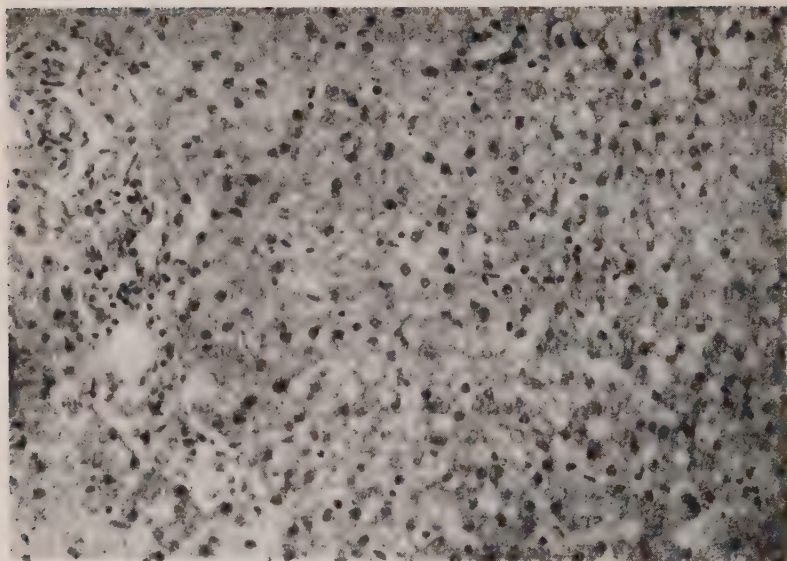


FIG. 1. — Foie. Enfant 4 mois 1/2, syndrome carentiel malin. Stéatose généralisée en fines gouttelettes, infiltration lymphocytaire discrète (R 842, Canet 58), $\times 220$.

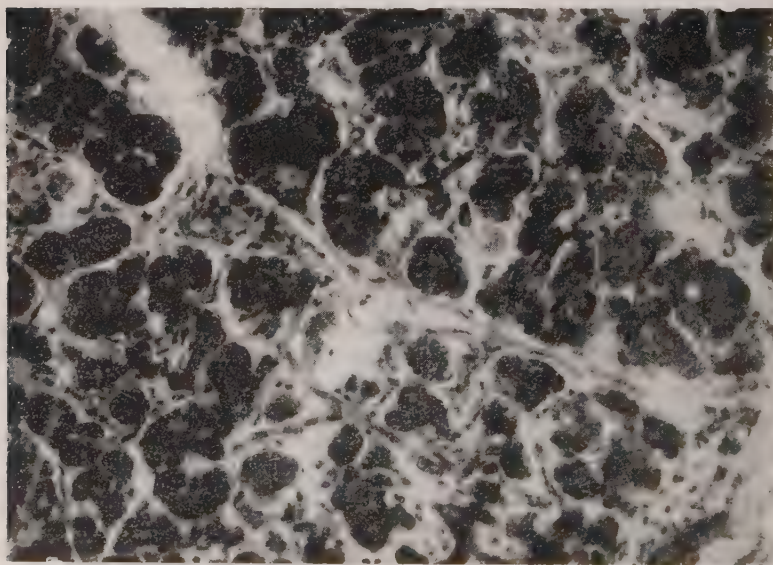


FIG. 3. — Enfant 40 jours nourri lait maternel. Pancréas : sclérose et nécrose étendue des acini (R 885, Canet 65), $\times 220$.

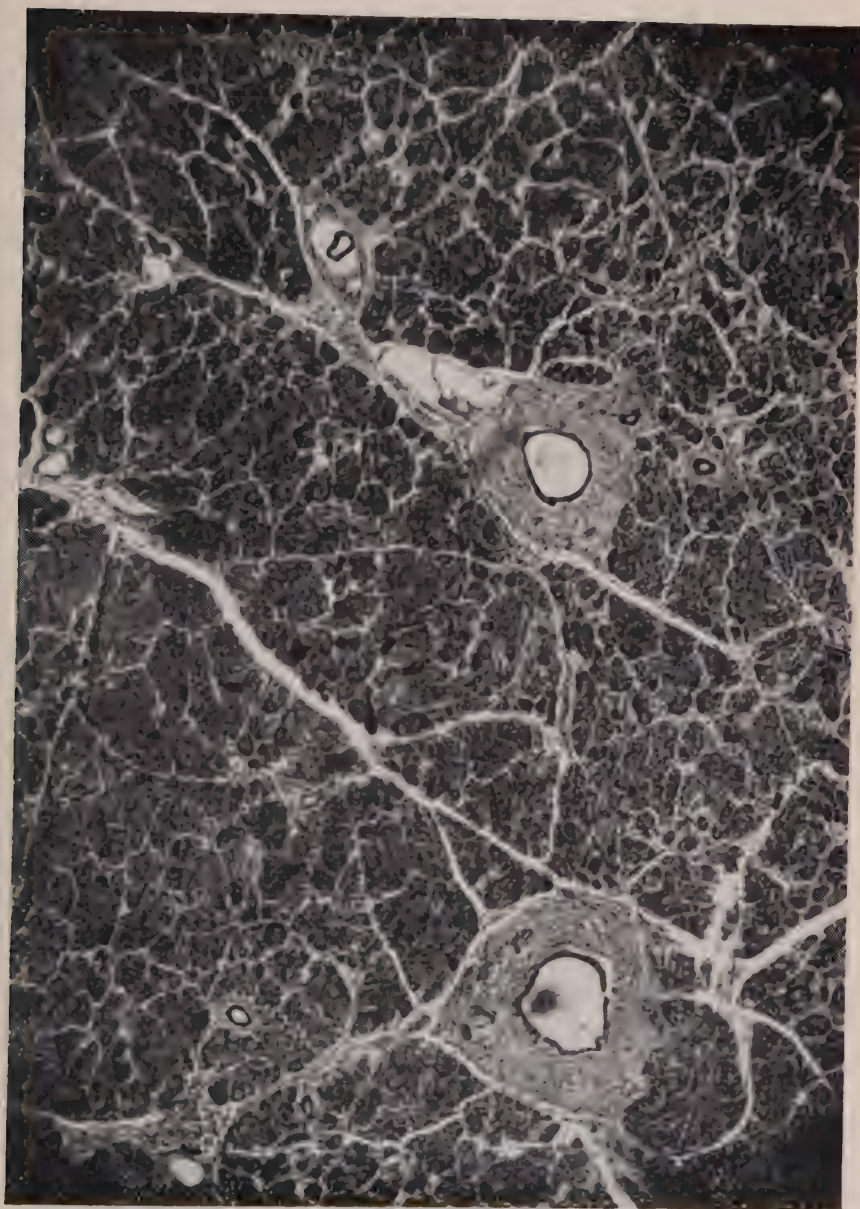


FIG. 2. — Enfant 2 ans, intoxication alimentaire aiguë.
Pancreas : sclérose mutilante et nécrose des acini (R. 874, Canet 64), $\times 22$.

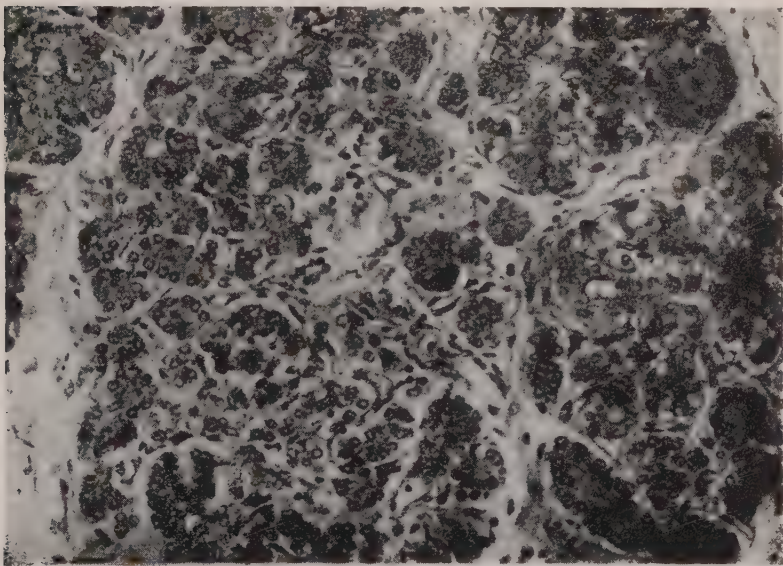


FIG. 4. — Nouveau-né, mort accidentelle.
Pancréas : sclérose et nécrose + de nombreux acini (R 843, Canet 59), $\times 220$.

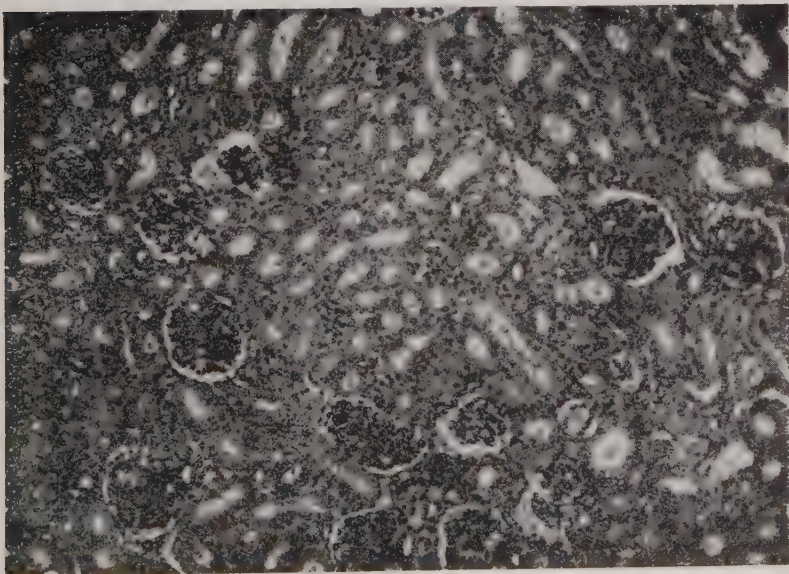


FIG. 5. — Enfant 1 mois 1/2 nourri lait et riz maché.
Rein : nécrose des glomérules et des tubes contournés (S 8, Canet 68), $\times 170$.

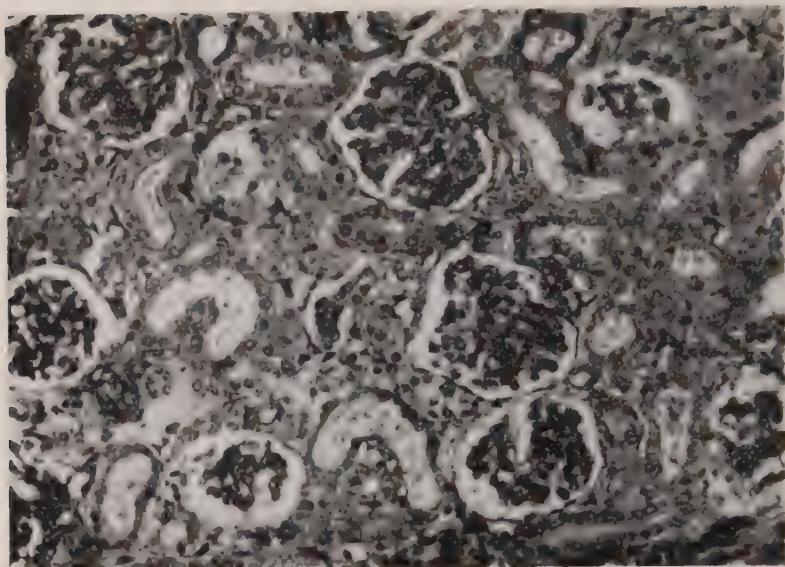


FIG. 6. — Mort-né à terme.
Rein : nécrose des glomérules et tubes contournés (R 843, Canet 59), $\times 220$.

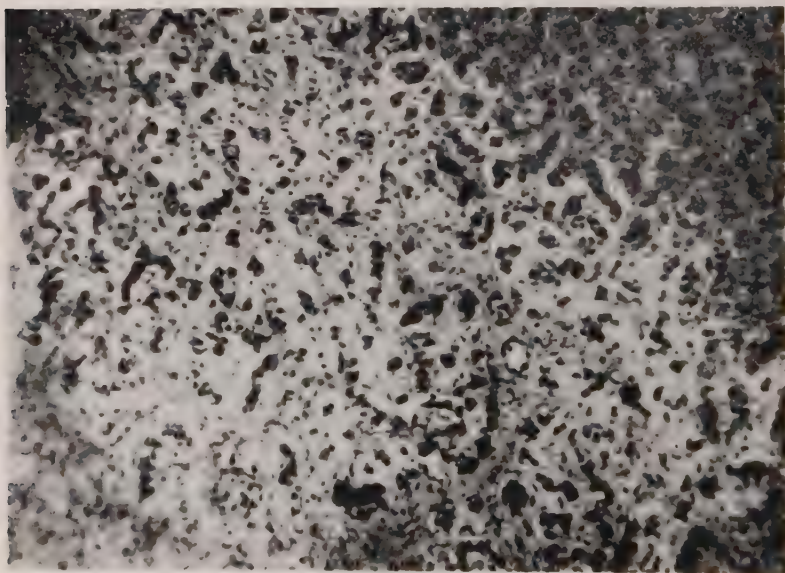


FIG. 7. — Enfant 4 mois 1/2 nourri lait maternel + riz maché.
Surrénale : stéatose et dissociation de la corticale (S 8, Canet 68), $\times 170$.



FIG. 8. — Enfant 2 ans, intoxication alimentaire aigüe. Surrénale : dissociation et stéatonecrose corticale.
Coupe à congélation (R 874, Canet 64), $\times 22$.

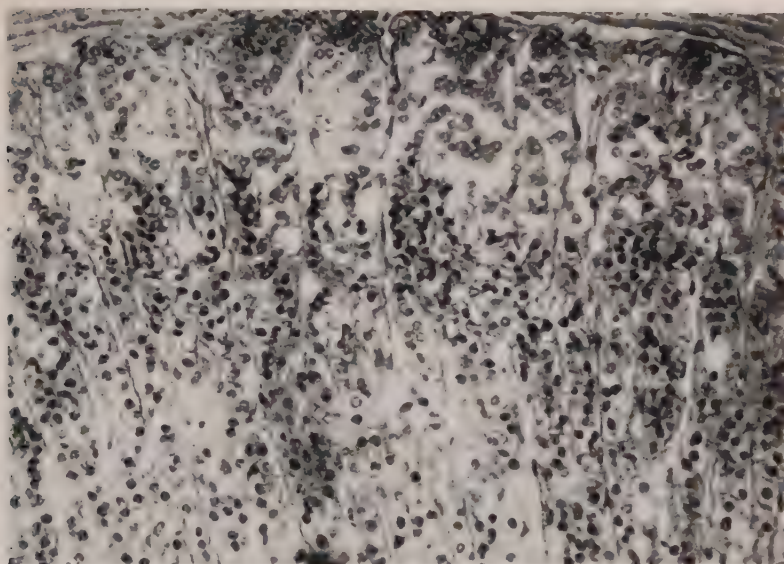


FIG. 9. — Enfant 4 mois 12, syndrome carentiel malin. Surrénale : dissociation et pycnose nucléaire de la zone fasciculée (R 842, Canet 58), $\times 220$.

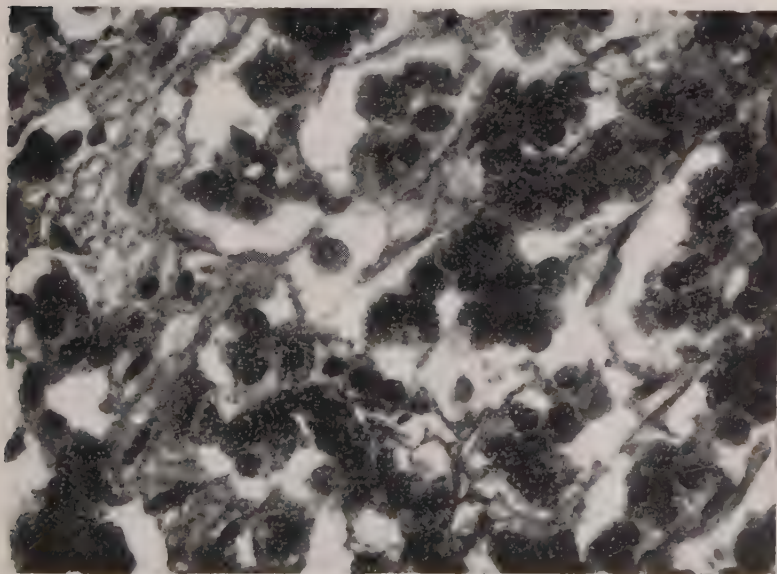


FIG. 10. — Enfant 2 ans, intoxication alimentaire aiguë. Surrénale : nécrose de la corticale (R 874, Canet 64), $\times 670$.

le décapage de la muqueuse et l'infiltration des espaces interglandulaires sont dus à des infections intercurrentes. Chez les enfants vietnamiens qui font l'objet de nos observations, ces dernières lésions ne revêtent, en aucun cas, la constance et la gravité que signale J. Delon au Maroc, à propos de la *maladie œdémateuse* du sevrage chez l'enfant musulman.

CONCLUSIONS.

Il paraît vraisemblable que, en dépit de leur haute léthalité, les troubles que nous avons décrits chez les nourrissons et les très jeunes enfants vietnamiens sont superposables, avec des variantes symptomatiques à ceux qui ont été précédemment observés sur l'enfant noir, soumis de bonne heure à un régime mal équilibré : ils surviennent dès les premiers mois de la vie et prennent leur intensité maxima au moment du sevrage, c'est-à-dire lorsque l'enfant vietnamien se trouve plus ou moins rapidement privé du lait maternel, lequel est remplacé par un régime pauvre en protides animales et trop riche en glucides. Le terme de « kwashiorkor » semble convenir pour le moment à toutes ces manifestations de carence du nourrisson et du jeune enfant. Toutefois, avant d'admettre une telle généralisation qui peut paraître un peu hâtive, il conviendrait de rassembler en différents centres des territoires d'outre-mer, une documentation clinique, anatomo-pathologique et biochimique plus abondante.

Au point de vue histopathologique en particulier, qui a spécialement retenu notre attention, le dossier est encore insuffisant. Toutefois les observations de Davies dans l'Ouganda, de Waterlow et de Hartz aux Antilles, concordent avec les nôtres dans leurs grandes lignes. La *nécrose des acini pancréatiques* y est considérée comme liée à la *stéatose hépatique*, ce qui nous apparaît également comme évident. Mais nous avons vainement cherché, dans les travaux cités, des indications précises sur l'état *des reins* et surtout *des surrénales* : nous avons cependant, de notre côté, constaté de très importantes lésions de ces derniers organes chez les enfants vietnamiens de moins d'un an décédés du syndrome que nous avons appelé « de la mort en cours de route » et même chez des prématurés de quelques mois ou des mort-nés à terme. Ces lésions, qui font l'objet principal de ce travail, et qui comportent essentiellement une infiltration lipidique et une dissociation de la corticale, accompagnent ou même précèdent la stéatose hépatique et la nécrose des acini pancréatiques. Sans chercher à nier le rôle probablement très marqué que jouent ces lésions des surrénales dans la constitution du syndrome décrit et notamment dans les accidents terminaux de choc, il nous paraît difficile de le considérer comme exclusif ainsi que le fait

Selye à propos de son « syndrome général d'adaptation ». Nous pensons avec J. Reilly que, dans ces phénomènes, intervient une atteinte de toutes les fonctions du système neuro-végétatif étroitement lié au système endocrine. Une interaction hormonale se produit sans doute dans laquelle l'hypophyse est peut-être en cause. Il serait intéressant d'examiner à cet égard la glande pituitaire, ce que nous nous proposons de réaliser ultérieurement.

Nous avons enfin insisté sur les lésions rénales, dont l'échelle de gravité s'étend de la simple dilatation des glomérules et des tubes contournés à la sclérose et à la nécrose granuleuse.

Nos constatations, qui portent actuellement sur une centaine de cas (autopsies et ponctions-biopsies du foie), demandent évidemment à être vérifiées sur une plus grande échelle : elles nous permettent néanmoins, dès maintenant, d'avoir une vue d'ensemble sur les troubles carentiels des jeunes Indochinois, de les assimiler sur le plan clinique, avec des variantes symptomatiques, au « kwashiorkor » des auteurs africains et, sur le plan histo-physiologique, aux phénomènes de Reilly, la malnutrition apparaissant ainsi comme un agent d'agression de premier plan parmi la population infantile de l'Indochine.

BIBLIOGRAPHIE

- J. BABLET et L. NORMET. *Bull. Acad. Méd. Paris*, 1937, **117**, 242.
 C. BERGERET. *Bull. Méd. A. O. F.*, 1948, **5**, 257.
 J. F. BROCK et M. AUTRET. *Org. mond. de la Santé : série de monographies*, 1952, n° 8.
 J. CANET. *Rev. Coloniale*, 1952, 198-199.
 M. CARVALHO et coll. *Il Pediatra Rio*, 1945, **40**, 395.
 M. CARVALHO, SCHMIDT et PINTO. *Il Pediatro Rio*, 1947, **13**, 141 et *Trop. Dis. B.*, 1947, **45**, 728.
 J. N. P. DAVIES. *Lancet*, 1948, **1**, 317.
 Ph. DECOURT. *Etudes et Documents*, vol. I. Hesperis, édit., Paris, 1951.
 Ph. DECOURT. *La Presse Méd.*, 12 avril 1952, n° 25, 532.
 Ph. DECOURT. *La Presse Méd.*, 7 mai 1952, n° 31, 663.
 Ph. DECOURT. *La Presse Méd.*, 9 juillet 1952, n° 47, 1028.
 J. DELON. *Maroc Médic.*, 1950, **29**, 333.
 J. DELON. *Maroc Médic.*, 1951, **30**, 578.
 H. HARTZ. *Doc. Neerlandica et Indonesica de morbis tropicis*, mars 1949, **1**, 41.
 G. NEZELOF. *Thèse de Paris*, 1951.
 H. SELYE. *Ann. d'Endocrinologie*, 1946, nos 5-6.
 P. V. VEGHELYI. *Lancet*, 1948, **1**, 497.
 J. C. WATERLOW. *Spec. Rep. med. Res. Coun.*, Lond., 1948, n° 263.
 C. D. WILLIAMS. *Arch. Dis. Child.*, 1933, **8**, 423.
 C. D. WILLIAMS. *Lancet*, 1935, **229**, 1151.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LEPTOSPIRES DU SUD-VIET-NAM

par M^{me} B. KOLOCHINE-ERBER, E.-R. BRYGOO, R. CROS et P. de LAJUDIE

(Institut Pasteur de Saigon.

Institut Pasteur de Paris, Service du D^r DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

C'est à Saigon, en 1930, que furent connus en Cochinchine les deux premiers cas de leptospirose humaine (Lavau, Ragiot, Souchard, Farinaud et Lieou, 1931 [1]). Au cours des années suivantes de nouveaux malades ont été hospitalisés à Saigon ; ils avaient contracté l'affection dans la ville même ou dans les environs plus ou moins éloignés : Cholon, Travinh, Tran-Ty (Ragiot et Delbove, 1933 [2] et 1934 [3] ; Massias, 1935 [4, 5] ; Ragiot, Delbove, Nguyen van Huong et Ho Thieu Ngan, 1935 [7] ; Ragiot, Moreau et Nguyen van Huong, 1936 [7] ; Nguyen Dinh Hao, 1938 [8]). En 1949, P. Rousset [9] rapporte 8 observations de malades soignés à l'hôpital Nouaille-Degorce, à Saigon : les uns appartenaient à la base militaire de Saigon, les autres venaient de Camau, Goden, Duc-Hoa, certains sujets étaient arrivés dans la région depuis onze à quinze mois.

Pour l'ensemble des malades, l'étiologie révèle que les sujets vivaient plus ou moins au voisinage des rats, au contact d'eaux souillées, qu'ils habitaient dans une région marécageuse ; des cas avaient été signalés parmi les travailleurs des rizières.

Le rôle des rats dans la région de Saigon-Cholon a été mis en évidence dès 1933 par les recherches de Souchard [10] : 3 à 7 p. 100 des rats de Saigon étaient infectés par *L. ictero-hemorrhagiæ*.

Le diagnostic des premiers cas de la maladie fut fait par l'examen clinique ; l'inoculation expérimentale de cobayes permettait de retrouver les lésions et d'isoler des leptospires par hémoculture. De 1935 à 1937, des séro-diagnostic furent faits à l'Institut Pasteur d'Hanoï par M. Vaucel pour les sérums des malades des hôpitaux de Saigon. A l'époque où M. Vaucel étudiait la leptospirose au Tonkin [11, 12, 13], peu d'espèces étaient connues : *L. ictero-hemorrhagiæ* (1915), *L. hebdomadis* (1917), *L. autumnalis* (1925). Le rôle des leptospires australiens (1923-1934) était encore confus. *L. grippo-typhosa* (1928) n'avait pas

encore place dans toutes les recherches et encore moins *L. canicola*, tout récemment découvert (1933-1934).

L'identification de nouvelles souches aurait élargi le champ d'études et permis de trouver, dans ces régions asiatiques, des espèces rencontrées en Indonésie, en Australie, au Japon, et dont la répartition est encore plus large. Au Tonkin, en 1936, M. Vaucel [14] isola d'un cas mortel soigné à l'hôpital Lanessan (Bigot [15]) un leptospire (souche Kébler), qui n'était pas identifiable aux trois espèces utilisées à cette époque pour les séro-diagnosics : *L. ictero-hemorrhagiæ*, souches japonaises et tonkinoises, *L. autumnalis* et *L. hebdomadis*, souches japonaises. Une autre souche fut isolée d'un enfant tonkinois malade, à Tuyen-Quang [16]; elle n'était pas identifiable aux trois souches citées et était différente aussi sérologiquement de la souche Kébler. M. Vaucel ne créa pas d'espèces nouvelles [17]. Les recherches poursuivies à Hanoï par M. Vaucel pour le dépistage sérologique des cas de leptospirose ictero-hémorragique ont été limitées au Tonkin; aucune prospection ne fut tentée en Cochinchine.

Après le retour de M. Vaucel en Europe, les séro-diagnosics pour les cas de leptospiroses constatés dans les services hospitaliers de Saigon furent faits à l'Institut Pasteur de cette ville à l'aide de souches isolées de cas locaux (*L. ictero-hemorrhagiæ*). C'est seulement après 1946 qu'un service de séro-diagnosics par agglutination pour les leptospiroses fut régulièrement organisé à Saigon à l'aide de souches autochtones de *L. ictero-hemorrhagiæ* et de souches provenant de la collection du Laboratoire des leptospiroses à l'Institut Pasteur de Paris [18]. Pour les cas dont le séro-diagnostic n'était pas d'accord avec les données cliniques, des échantillons de sérums ont été envoyés à Paris afin que le séro-diagnostic d'orientation fait à Saigon soit complété par l'essai d'un plus grand nombre d'espèces. Ainsi ce n'était plus seulement trois espèces qui servaient à effectuer des séro-diagnosics, mais 10 à 12 et ce nombre pouvait encore être augmenté en comprenant dans la série des souches atypiques d'espèces connues ou des souches incomplètement identifiées.

De 1947 à 1951 [18], 9 souches de leptospires ont été isolées à l'Institut Pasteur de Saigon et ont été envoyées ou apportées à Paris, au Laboratoire des leptospiroses de l'Institut Pasteur, afin d'y être identifiées. C'est ainsi qu'ont été trouvées une souche de *L. ictero-hemorrhagiæ* A (1949), deux souches de *L. canicola* (1950), quatre souches de *L. bataviæ* en 1947 et 1950, deux souches de *L. australis* en 1951. Ces trois dernières espèces n'étaient pas connues en Cochinchine.

A propos de la technique d'identification des souches. — Pour identifier ces leptospires, il fallait posséder le plus grand nombre

possible d'espèces de leptospires connues et de souches atypiques ou non classées, ainsi que les sérums agglutinants préparés avec les souches en question.

**Liste des espèces et souches de leptospires
employées pour l'identification des souches vietnamiennes.**

| | |
|--|---|
| <i>L. ictero-hemorragiæ</i> : Verdun, Touz..., Roch... (souches françaises); Wijnberg AB, Kantorowicz A. | <i>L. pyrogenes</i> Zanoni, Salinem. |
| <i>L. grippo-typhosa</i> : Andaman CH31. Moscou V, Lou... (souche française). | <i>L. javanica</i> VB46. |
| <i>L. canicola</i> chien Chiffon C7, chien Cochin (souches françaises). | <i>L. schuiffueri</i> 90C. |
| <i>L. sejroe</i> M84. | <i>L. mitis</i> Johnson. |
| <i>L. bataviæ</i> van Thienen. | <i>L. poi</i> type. |
| <i>L. pomona</i> type <i>australis</i> C et souches suisses du Dr Gsell. | <i>L. saxkoebing</i> M24. |
| <i>L. australis</i> Ballico. | <i>L. bovis</i> Olitzski. |
| <i>L. hebdomadis</i> type. | <i>L. ballum</i> S102. |
| <i>L. autumnalis</i> type. | <i>L. medanensis</i> Hond HC. |
| | Souches Jaw-Jit, Rachmat, Naam 3645, Sentot 3726, Djassiman, Sarmin. |
| | Leptospires aquicoles : Erlangen, Montargis. |

Les souches de leptospires de la collection du laboratoire ont des histoires diverses : les unes ont été isolées au laboratoire, d'autres ont été demandées à des laboratoires étrangers (1) qui les ont aimablement envoyées ; certaines étaient entretenues dans la collection depuis plusieurs années, quelques-unes ont été acquises en vue de compléter les recherches.

Pour ces souches existait une provision de sérums agglutinants expérimentaux. Le lapin est bon producteur d'anticorps agglutinant les leptospires. Après trois injections intrapéritonéales de 5 cm³ de culture de leptospires jeune, vivante, faites chacune à une semaine d'intervalle, les lapins sont saignés à la carotide au bout de dix jours. Le sérum recueilli aseptiquement, dosé en présence de la souche correspondante, est réparti en ampoules et conservé à la glacière. Selon la même méthode, les 9 souches ont servi à préparer les sérums expérimentaux nécessaires pour le contrôle de l'identification et la recherche des coagglutinines. Avec chaque souche, 2 lapins sont toujours injectés. Les chiffres qui sont donnés dans le texte indiquent le taux des sérums de l'un ou l'autre lapin si les réponses du titrage ont été les mêmes pour chacun, ou bien seulement le taux

(1) Professeur J. W. Wolff, d'Amsterdam ; professeur C. Borg Petersen, de Copenhague ; professeur P. Mino, de Vercelli ; professeur B. Babudieri, de Rome ; Dr O. Gsell, de Saint-Gall. Nous sommes heureux de remercier ici tous ceux qui nous ont aidés dans notre travail.

le plus élevé si les limites n'ont pas été les mêmes pour les deux animaux préparés.

La technique des agglutinations est celle qui est employée au laboratoire depuis de longues années [49]. La lecture d'une goutte du mélange sous lamelle, à un grossissement moyen (oc. 4, obj. 6), permet d'observer la lyse avec une grande précision et de dépister des amas d'agglutination bien au delà de la phase maxima. La lecture des séro-agglutinations a toujours été faite après deux heures de contact à l'étuve, à 37°, des mélanges sérums-cultures.

Les épreuves de saturation ont été conduites suivant la technique courante, mais étant donné le taux limite élevé de certains sérums anti-leptospires, le sérum a dû être dilué au 1/1 000 pour l'absorption des agglutinines, ce qui a empêché de rechercher les agglutinations comparatives à un taux faible.

IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLÉES A SAIGON.

I. Souche Su... isolée à l'Institut Pasteur de Saigon, en novembre 1949, par les D^{rs} R. Cros et J. Demarchi.

Le malade était hospitalisé à l'hôpital Grall (D^r Porte). Il s'agissait d'un cas de leptospirose anictérique, curable. Un cobaye fut inoculé par voie intrapéritonéale, le deuxième jour de la maladie, avec 5 cm³ de sang ; il mourut le sixième jour (ictère, congestion généralisée, leptospirurie). Au cours de passages de cobaye à cobaye, une hémoculture a permis d'isoler un leptospire qui provoqua la mort des cobayes en quatre à cinq jours avec hypothermie (ictère, hémorragies).

La culture fut envoyée à Paris en avril 1950. L'inoculation au cobaye confirme les observations faites à Saigon. Des passages, au nombre de six, comprenant en tout 15 animaux, montrent une légère atténuation de la virulence : le maximum thermique est noté au quatrième-cinquième jour ; la mort survient du sixième au septième jour. L'ictère est pâle, les hémorragies sont abondantes et étendues sous la peau et dans les organes ; lésions classiques des poumons, leptospires dans le foie ; plusieurs cobayes ont des hémorragies nasales, vulvaires ou intestinales. Deux mois plus tard, une culture a tué 1 seul cobaye sur 7.

La souche est donc pathogène pour le cobaye, peu ictérogène, fortement hémorragique et sa virulence s'atténue vite.

1° Action de divers sérums anti-leptospires (sérums expérimentaux de lapins) sur le leptospire Su... [culture] (1^{er} tableau, p. 612).

L'essai a été fait avec d'autres sérums agglutinants préparés avec les souches suivantes : *L. grippo-typhosa*, *L. bataviae* van Thienen et souche de Saigon, *L. pomona*, *L. sejrøe*, *L. bovis*, *L. mitis*, *L. ballum*, *L. hebdomadis*, *L. autumnalis*, *L. pyrogenes* Salinem.

2° Préparation d'un sérum anti-Su... — Le sérum agglutine la souche homologue jusqu'à 1/500 000 ; limite de la lyse à 1/50 000.

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | | | CULTURE souche Su. . |
|--------------------------------|-----------------|---------|-------------------------|
| Espèces | Souches | Titre | |
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> . | Verdun. | 500 000 | 50 000 |
| | Roch... | 500 000 | 20 000 |
| | Tou... | | 10 000 |
| <i>L. canicola</i> | C7. | 500 000 | 30 000 |
| | Chien Cochin. | | 10 000 |
| | Kéb... (Saigon) | | 10 000 |

3° Essai d'agglutination de leptospires de diverses espèces par le sérum anti-Su...

| ESPÈCES | SOUCHES | SÉRUM agglutinant la souche Su... à 1/500 000 |
|------------------------------------|--------------|--|
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> . . . | Verdun. | 10 000 |
| | Roch... | 20 000 |
| | Kantorowicz. | Inf. 10 000 |
| <i>L. canicola</i> | Wijnberg. | 10 000 |
| | C7. | 10 000 |

Les sérums expérimentaux agglutinant *L. grippo-typhosa*, *L. sejrae*, *L. bataviae*, *L. pomona*, *L. mitis*, *L. bovis*, *L. hebdomadis*, *L. autumnalis* n'ont pas agglutiné les leptospires de la souche Su...

4° Les réponses des actions croisées de la culture sur les divers sérums agglutinants, d'une part, et de divers sérums expérimentaux sur la culture de la souche Su..., d'autre part, ne permettent pas l'identification puisque les taux d'agglutination sont compris entre des limites communes à plusieurs souches des deux espèces *L. ictero-hemorrhagiæ* et *L. canicola*.

Une double épreuve de saturation des agglutinines a été faite :

| SÉRUM DE LAPIN SU... saturé par | AGGLUTINATION DE | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| | <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> Verdun | <i>L. canicola</i> C7 |
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> . . . | 0 | 0 |
| <i>L. canicola</i> | 500 | 0 |
| | (examen macroscopique). | |

Chaque épreuve montre qu'il n'y a pas d'anticorps vrais pour

L. canicola. Le leptospire Su... appartient à l'espèce *ictero-hemorrhagiae*.

5° Un essai d'agglutination de la souche Su... par des sérums expérimentaux (2) agglutinant la souche de *L. canicola* Hond Utrecht IV et les souches *L. ictero-hemorrhagiae* Kantorowicz A et Wijnberg AB ont donné les réponses suivantes :

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | SOUCHE SU... | |
|--|--------------|---------------|
| | Lyse | Agglutination |
| <i>L. canicola</i> Hond Utrecht IV | 100 | 1 000 |
| <i>L. ictero-hemorrhagiae</i> Wijnberg AB . | 1 000 | 30 000 |
| <i>L. ictero-hemorrhagiae</i> Kantorowicz A. | 50 000 | 100 000 |

L. ictero-hemorrhagiae Su... doit être rapprochée de la souche Kantorowicz A.

La souche de leptospire Su..., isolée d'un cas de leptospirose anictérique à Saigon, est un *L. ictero-hemorrhagiae* ; elle doit être classée parmi les souches du groupe A ; elle donne des coagglutinines pour *L. canicola* à un titre élevé. Pathogène pour le cobaye (ictère, hémorragies, leptospirurie), elle semble perdre rapidement sa virulence.

Le fait qu'un leptospire de l'espèce *ictero-hemorrhagiae* a été isolé en Sud-Viet-Nam n'est pas une nouveauté puisque, dans les Instituts Pasteur de Saigon et d'Hanoi, des souches avaient été isolées. La particularité de cette souche c'est qu'elle se classe parmi les biotypes A de l'espèce, mais la connaissance des biotypes [20, 21] est postérieure aux premiers travaux sur les leptospires poursuivis par M. Vaucel en Indochine.

II. Souche Kéb... isolée à l'Institut Pasteur de Saigon, en avril 1950, par les D^{rs} R. Cros et P. de Lajudie.

Le leptospire de la souche Kéb... a été isolé par hémoculture d'un cobaye inoculé avec le sang d'un malade nord-africain (hôpital Grall, D^r de Jaureguiberry), qui mourut le lendemain du jour du prélèvement avec des symptômes méningés importants. Le cobaye présentait une affection fébrile mortelle en douze jours ; les lésions étaient typiques. L'examen direct du foie à l'ultra-microscope ne montra pas de leptospires. L'inoculation du sang du cœur au cobaye lui donna une maladie ictérique mortelle en huit jours ; il y avait des leptospires dans le foie.

(2) Reçus grâce à l'obligeance de M. le professeur J. W. Wolff. d'Amsterdam

Peu de temps avant la mort du malade, un prélèvement de liquide céphalo-rachidien fut effectué (soit environ vingt-quatre heures après la prise de sang) ; on nota une faible réaction cellulaire (45 éléments), des leptospires étaient visibles sur fond noir. L'inoculation de 5 cm³ de liquide à un cobaye, par voie intrapéritonéale, le tua en sept jours après une hyperthermie à 41°-42° les cinquième et sixième jours ; un nouveau passage au cobaye tua l'animal en huit jours. Chaque fois l'ictère existait. L'inoculation d'un broyat d'organes du dernier animal provoqua une leptospirose longuement évolutive puisque le cobaye succomba le vingt-troisième jour, anictérique, mais porteur de leptospires dans le foie et les reins ; l'hyperthermie s'était manifestée les septième et huitième jours (41°) et le dix-neuvième jour (40°5).

La souche de leptospires Kéb... fut apportée à Paris en juillet 1950, soit environ trois mois après l'isolement. Deux cobayes ont été alors inoculés par voie intrapéritonéale avec 2 cm³ de culture jeune du premier repiquage. La courbe de température a montré une élévation les cinquième et huitième jours, nette surtout pour l'un d'eux : 40°-41°1. Les cobayes ont été observés régulièrement pendant vingt jours, ils ont survécu et sont morts deux mois après l'inoculation, porteurs de lésions de pasteurellose. Le leptospire avait perdu sa virulence au moment de l'arrivée de la souche en France ; cette perte de virulence s'annonçait lors des dernières inoculations faites à Saigon, par une durée prolongée de la maladie.

1° *Action de divers sérums anti-leptospires (sérums expérimentaux de lapins) sur le leptospire de la souche Kéb... (culture).*

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | | | CULTURE souche Kéb... |
|--------------------------------|---------|---------|--------------------------|
| Espèces | Souches | Titre | |
| <i>L. canicola</i> | C7. | 500 000 | 50 000 |
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> . | Verdun. | 500 000 | 1 000 |
| <i>L. ballum</i> , | S102. | 10 000 | 1 000 |

Les réponses furent négatives avec les sérums anti-leptospires préparés avec les espèces suivantes : *L. grippo-typhosa*, *L. bataviae*, *L. sejracæ*, *L. pomona*, *L. mitis*, *L. bovis*, un leptospire aquicole non pathogène.

2° *Préparation d'un sérum agglutinant la souche Kéb...* — Le sérum agglutine la souche homologue à 1/500 000.

3° *Essai d'agglutination de leptospires de diverses espèces par le sérum anti-Kéb...* (1^{er} tableau, p. 615).

Les résultats furent négatifs en présence des cultures de *L. grippo-typhosa*, *L. bataviae*, *L. sejracæ*, *L. pomona*, *L. mitis*, *L. bovis*, d'un leptospire aquicole non pathogène.

4° *Epreuve de saturation des agglutinines.* — Le leptospire Kéb... est agglutiné par un sérum anti-*L. canicola* et le sérum anti-Kéb... agglutine *L. canicola*, mais il y a discordance entre le taux limite des sérums expérimentaux de chaque souche et les taux limites des agglu-

| ESPÈCES | SOUCHES | SÉRUM agglutinant la souche Kéb... à 1/500 000 |
|-----------------------------------|---------|---|
| <i>L. canicola</i> | C7. | 50 000 |
| <i>L. ictero-hemorragiæ</i> . . . | Verdun. | 1 000 |
| <i>L. ballum</i> | S102. | 100 |

tinations croisées. Le leptospire Kéb... peut-il être dénommé *L. canicola*, ou bien appartient-il à une souche qui donne des coagglutinines pour cette espèce ? L'épreuve de saturation des agglutinines donne la réponse.

| SÉRUMS | CULTURE C7 | CULTURE KÉB... |
|--|-----------------------------|-------------------------|
| Anti-C7 (1/1 000) saturé par Kéb... Anti-C7 pur | > 10 000 Dépasse 500 000 | > 10 000 500 000 (1) |
| Anti-Kéb .. (1/1 000) saturé par C7. . Anti-Kéb. pur. | 6 000 100 000 | 6 000 100 000 |

(1) Lecture après 24 heures à la température ordinaire.

Le leptospire de la souche Kéb..., isolée d'un malade à Saigon, est un *L. canicola* qui donne des coagglutinines faibles pour *L. ictero-hemorragiæ* et des traces encore plus minimales pour *L. ballum*. Le leptospire était virulent pour le cobaye après l'isolement, tuait l'animal en sept à douze jours. La souche obtenue du liquide céphalo-rachidien perdit dès le deuxième passage son pouvoir ictérigène et le cobaye mourut le vingt-troisième jour. Trois mois environ après l'isolement le leptospire avait à peu près perdu sa virulence.

III. Souche Köl... isolée à l'Institut Pasteur de Saigon, en avril 1950, par les D^{rs} R. Cros et P. de Lajudie.

Le leptospire de la souche Köl... a été isolée par hémoculture d'un cobaye inoculé avec le sang d'un malade (hôpital Grall, D^r de Jaureguiberry) au douzième jour de l'évolution de l'affection (qui fut terminée par la guérison). Deux passages successifs ont permis de retrouver le leptospire, de noter la durée de la maladie du cobaye : dix, huit, douze jours, et l'hyperthermie avant la mort : 40°, 41°, 41°5.

Cette souche fut apportée à Paris en juillet 1950. Deux cobayes inoculés moururent le cinquième et le dixième jour, anictériques,

porteurs d'hémorragies inguinales, pulmonaires et sous-cutanées. Les leptospires ne furent pas décelés à l'examen sur fond noir, mais l'hémoculture faite pour l'un des cobayes, dont le foie renfermait des leptospires, confirma la nature de l'agent infectieux. La souche est donc pathogène pour le cobaye, mais irrégulièrement ictérogène.

1° Action des divers sérums anti-leptospires (sérums expérimentaux de lapins) sur la souche Köl... (culture).

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | | | CULTURE |
|---------------------------------------|---------|---------|---------------|
| Espèces | Souches | Titre | souche Köl... |
| <i>L. canicola</i> | C7. | 500 000 | 100 000 |
| <i>L. canicola</i> | Kéb.. | 500 000 | 100 000 |
| <i>L. ictero-hemorragiæ</i> | Verdun. | 500 000 | 10 000 |
| <i>L. ictero-hemorragiæ</i> | Roch... | 500 000 | 10 000 |
| <i>L. ictero-hemorragiæ</i> | Su... | 500 000 | 10 000 |

Les réponses furent négatives pour les sérums anti-leptospires préparés avec les espèces suivantes : *L. grippo-typhosa*, *L. bataviae* van Thienen et Saigon W 947, *L. sejrae*, *L. pomona*, *L. mitis*, *L. bovis*, *L. ballum*, un leptospire aquicole non pathogène.

2° Préparation d'un sérum agglutinant la souche Köl... — Le sérum agglutine la souche homologue à 1/500 000.

3° Essai d'agglutination de leptospires de diverses espèces par le sérum anti-Köl... Les résultats furent négatifs en présence des cultures

| ESPÈCES | SOUCHES | SÉRUM agglutinant la souche Köl... à 1/500 000 |
|---------------------------------------|---------------|---|
| <i>L. canicola</i> | C7. | 500 000 |
| <i>L. canicola</i> | Kéb... | 500 000 |
| <i>L. ictero-hemorragiæ</i> | Verdun. | 10 000 |
| <i>L. ictero-hemorragiæ</i> | Su .. | 10 000 |
| <i>L. icterohemorragiæ</i> | Roch ... | 10 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Van Thienen. | 100 |
| <i>L. bataviæ</i> | Saigon W 947. | 10 000 |
| <i>L. ballum</i> | S102. | 1 000 |

de *L. grippo-typhosa*, *L. sejrae*, *L. pomona*, *L. mitis* et un leptospire non pathogène de l'eau.

4° Epreuve de saturation des agglutinines. — Le leptospire Köl... est agglutiné par le sérum de deux souches de *L. canicola* (C7 française et Kéb... saïgonnaise) à un taux élevé par rapport au titre des sérums expérimentaux ; le sérum anti-Köl... agglutine les cultures des deux mêmes souches à la limite de son titre. Ces deux résultats sont en faveur de l'attribution de la souche à l'espèce *L. canicola*.

Mais, dans les deux cas, on note des coagglutinines pour *L. ictero-hemorrhagiae* à un taux qui est au plus égal au 1/10 du taux limite. Une épreuve de saturation des agglutinines permet une conclusion nette pour l'attribution de l'espèce.

| SÉRUMS | CULTURE <i>L. canicola</i> | | | CULTURE <i>L. ictero-hemorrhagiae</i> Verdun |
|--------------------------------------|----------------------------|----------|----------|--|
| | Köl... | Kéb... | C7 | |
| Anti-C7 (1/1 000) saturé par Köl. | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | 10 000 |
| Anti-C7 pur | 500 000 | 500 000 | 500 000 | 10 000 |
| Anti-Köl... (1/1 000) saturé par C7. | 6 000 | 6 000 | 6 000 | 10 000 |
| Anti-Köl... pur. | 500 000 | 500 000 | 500 000 | 10 000 |

Le leptospire de la souche Köl... isolé d'un malade à Saigon est un *L. canicola* qui possède des coagglutinines pour *L. ictero-hemorrhagiae*, pour une souche autochtone de *L. bataviae* et pour *L. ballum*. Le leptospire est pathogène pour le cobaye, peu ictérogène, il donne des hémorragies d'aspect et de répartition classiques.

Des leptospires de l'espèce *canicola* n'ont pas été encore isolés en Sud-Viet-Nam. Les deux souches Kéb... et Köl... proviennent de malades compris dans un groupe assez nombreux représentant une véritable épidémie de leptospirose dont l'agent causal ne fut pas isolé; cependant les séro-diagnostic des malades laissent à penser que les contaminations par *L. canicola* furent une exception. *L. canicola* est moins fréquemment rencontré que *L. ictero-hemorrhagiae*, mais son aire de répartition est cependant très vaste. Cette espèce a été trouvée en Extrême-Orient et aussi dans des régions où sa présence n'avait pas encore été décelée parce que les chiens étaient aussi porteurs d'autres leptospires que *L. canicola*.

En 1940, Snapper et ses collaborateurs ont trouvé *L. canicola* dans la Chine du Nord [22], Yamamoto l'a probablement isolé au Japon [23]. Plus récemment, Wolff, Loman et Wielenga-Bergman identifièrent cette espèce en Indonésie [24]. La présence de *L. canicola* dans le Sud-Viet-Nam n'est donc pas pour surprendre et si des recherches sérologiques étaient poursuivies systématiquement sur des sérums de chiens on trouverait probablement des séro-diagnostic positifs pour cette espèce.

IV. Souche Saigon W 947, isolée à l'Institut Pasteur de Saigon, en septembre 1947, par les D^{rs} Heuls et Linhard.

Le malade, soigné à l'hôpital Nouaille-Degorce, présentait une « fièvre ictéro-hémorragique ».

A Saigon, l'inoculation au cobaye de 2 cm³ de sang par la voie intrapéritonéale permit de pratiquer une hémoculture qui donna la souche Saigon W 947. Le cobaye mourut le dixième jour, présentant des lésions typiques de leptospirose.

La culture fut apportée à Paris en novembre 1947.

Pouvoir pathogène. — Un cobaye inoculé avec 3 cm³ de culture par voie intrapéritonéale est trouvé mort le septième jour (ictère, hémorragies nettes et étendues, leptospores dans le foie et l'urine). Au cours de trois séries de passages poursuivies après la première inoculation, la survie des cobayes a été de cinq à sept jours ; elle a été de huit à neuf jours pour ceux qui avaient reçu du broyage de foie de cobayes sacrifiés le troisième jour, c'est-à-dire dont l'organisme était encore pauvre en leptospores. Les lésions ont été les mêmes et des leptospores ont été trouvés chaque fois que les autopsies ont pu être faites immédiatement après la mort. La souche Saigon W 947 est pathogène pour le cobaye qui meurt en cinq à sept jours, éventuellement en huit à dix jours, avec de l'ictère et des hémorragies.

1° *Action de divers sérums anti-leptospores (sérums expérimentaux de lapins) sur le leptospore de la souche Saigon W 947. (culture).* — Le sérum anti-*L. bataviae*, qui agglutine la souche homologue à 1/500 000, agglutine également à ce taux la souche Saigon W 947. L'essai a été fait avec d'autres sérums agglutinants préparés avec les espèces suivantes : *L. ictero-hemorrhagiae* (3 souches), *L. grippo-typhosa*, *L. canicola*, *L. sejrae*, *L. pomona* et un leptospore de l'eau. Aucune agglutination n'a été observée.

2° *Préparation d'un sérum expérimental agglutinant la souche Saigon W 947.* — Le sérum agglutine la souche homologue à 1/500 000 ; la limite de la lyse est comprise entre 1/50 000 et 1/100 000.

3° *Essai d'agglutination de leptospores de diverses espèces par le sérum anti-Saigon W 947.* — Le sérum agglutine les leptospores de l'espèce *bataviae* à 1/100 000. Une souche de *L. ictero-hemorrhagiae* (Verdun) est faiblement agglutinée (1/100). Les réponses sont négatives pour *L. ictero-hemorrhagiae* (souches Kantorowicz et Wijnberg), *L. grippo-typhosa*, *L. canicola*, *L. sejrae*, un leptospore aquicole (Erlangen).

D'autre part, le pouvoir agglutinant des sérums anti-*L. bataviae* van Thienen et anti-Saigon W 947 a été recherché non seulement pour les souches homologues mais pour *L. bataviae oryzei* Pavia I. Les réponses ont été identiques pour les trois souches, les limites de l'agglutination étant à 1/100 000.

La souche de leptospore Saigon W 947, isolée d'un malade à Saigon, est un *L. bataviae*. Le leptospore est pathogène pour le cobaye qui meurt en cinq à dix jours, ictérique et porteur d'hémorragies étendues. Il faut remarquer que cette souche a été isolée en 1947, qu'à ce moment elle n'a pas pu être comparée à autant d'espèces que les souches isolées postérieurement soit parce que ces souches ne figuraient pas dans la collection du

laboratoire et qu'il était difficile de les obtenir, soit parce qu'elles n'étaient pas encore connues.

V. Souche Sim... isolée en octobre 1950, à l'Institut Pasteur de Saigon, par les D^{rs} P. de Lajudie et E. Brygoo.

Il s'agissait d'un cas de leptospirose anictérique, faiblement hémorragique : injection conjonctivale avec ecchymose sous-conjonctivale, congestion de la base pulmonaire droite (hôpital Grall, D^r Porte). Le sang fut inoculé le second jour de la maladie à un cobaye qui mourut le seizième jour : lésions hémorragiques, ictère, leptospires dans le foie, hémoculture positive. Un cobaye inoculé avec un broyat de foie et de rein présenta une maladie bénigne, mise en évidence par un clocher thermique (41°5) le quatrième jour. L'hémoculture pratiquée au moment de l'accès fut positive ; elle donna au cobaye une maladie mortelle en six jours avec ictère, suffusions sanguines et présence de leptospires dans le foie.

La culture fut envoyée à Paris en novembre 1950. Deux cobayes ont été inoculés par voie intrapéritonéale (2 cm³ de culture) et sont morts l'un le cinquième jour, l'autre le sixième jour. Tous les deux ont présenté du subictère, des hémorragies inguinales et axillaires, congestion des épидидymes. Les leptospires sont très rares dans le foie (mais l'autopsie a été faite après un séjour de vingt heures à la glacière) ; néanmoins, hémoculture et culture du foie sont positives dès le cinquième jour.

La souche est pathogène pour le cobaye, mais elle ne tue pas tous les animaux ; l'ictère est plus ou moins intense, les lésions hémorragiques sont constantes à l'autopsie.

1° *Action de divers sérums anti-leptospires (sérums expérimentaux de lapins) sur le leptospire de la souche Sim... (cultures).*

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | | | CULTURE de la souche Sim... |
|-----------------------------|---------------|---------|--------------------------------|
| Espèces | Souches | Titre | |
| <i>L. bataviæ</i> | Van Thienen. | 500 000 | 100 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Saigon W 947. | 500 000 | 100 000 |
| <i>L. mitis</i> | Johnson. | 20 000 | 500 |

L'essai a été fait avec d'autres sérums agglutinants préparés avec les espèces suivantes : *L. ictero-hemorragiæ* (3 souches), *L. grippotyphosa*, *L. canicola*, *L. sejræ*, *L. pomona*, *L. bovis*, *L. ballum*, un leptospire non pathogène de l'eau. Aucun de ces sérums n'a agglutiné les leptospires de la souche.

2° *Préparation d'un sérum expérimental anti-Sim... —* Le sérum agglutine la souche homologue à 1/1 000 000.

3° *Essai d'agglutination de leptospires de diverses espèces par le sérum anti-Sim...*

| ESPÈCES | SOUCHES | SÉRUM agglutinant la souche Sim... à 1/1 000 000 |
|------------------------------------|--------------|---|
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> . . . | Verdun. | 1 000 |
| <i>L. canicola</i> | C7. | 1 000 |
| <i>L. canicola</i> | Kéb... | 100 |
| <i>L. canicola</i> | Köl... | 100 |
| <i>L. mitis</i> | Johnson. | 1 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Van Thienen. | 200 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Saigon W947. | 500 000 |

Les sérums agglutinant spécifiquement *L. grippo-typhosa*, *L. sejræ*, *L. pomona*, *L. ballum*, *L. bovis*, un leptospire non pathogène de l'eau ne donnent aucune trace d'agglutination.

La souche de leptospire Sim..., isolée d'un malade à Saigon, est un *L. bataviæ* qui donne des coagglutinines pour *L. mitis* (1/1 000), pour *L. ictero-hemorrhagiæ* et pour *L. canicola* (1/1 000). Il y a aussi des coagglutinines pour les souches saigonnaises Kéb... et Köl... qui appartiennent à l'espèce *canicola*; le taux des agglutinines ne dépasse pas 1/100, réponse plus faible que pour la souche française C7, bien qu'il s'agisse de souches autochtones.

Le leptospire est pathogène pour le cobaye : mort en seize jours après la première inoculation, le cinquième-sixième jour après quelques passages. Les lésions hémorragiques étaient les mêmes deux mois après l'isolement, mais le pouvoir ictérigène était atténué.

VI. Souche Mar..., isolée à l'Institut Pasteur de Saigon, en octobre 1950, par les D^{rs} P. de Lajudie et E. R. Brygoo.

Le malade (hôpital Grall, D^r de Jaureguiberry) présentait une leptospirose avec ictère, myalgies, anurie, syndrome hémorragique; il mourut le onzième jour, d'une hémorragie cérébrale, alors que tous les signes cliniques avaient rétrogradé.

Le cobaye inoculé avec le sang meurt le douzième jour, après avoir présenté un clocher fébrile à 40°5 le huitième jour; il a de l'ictère, des hémorragies; les leptospires sont visibles sur les frottis. Quelques passages successifs ont montré, pour tous les cobayes, un clocher fébrile au troisième jour, parfois suivi d'un autre au cinquième jour; certains animaux sont morts le douzième jour, d'autres ont guéri après la phase fébrile.

La culture de la souche fut envoyée à Paris en octobre 1950.

Morphologie. — L'examen des cultures montre nettement des leptospires sous deux aspects : des formes classiques ayant le crochet net

aux deux extrémités, d'autres, presque effilées à chaque bout dont le crochet est à peine marqué. Ces deux aspects s'observent dans le milieu de Stuart, dans celui de Reiter et de Ramme. Les leptospires des deux formes sont également mobiles. L'aspect n'est pas exceptionnel, on l'observe dans des cultures de *L. bataviae* et de *L. sejrae*.

Pouvoir pathogène. — Deux cobayes ont été inoculés par voie intrapéritonéale avec 2 cm³ de la culture. L'un d'eux a survécu sans avoir présenté d'élévation thermique notable ; le second a eu un clocher fébrile à 40°3-40°6 les quatrième-cinquième jours, suivi de défervescence (38°) le sixième jour ; il est mort le septième jour sans lésions notables. La virulence de la souche, qui était faible lors de l'isolement, s'était encore atténuée au cours des mois suivants.

1° *Action de divers sérums anti-leptospires (sérums expérimentaux de lapins) sur la leptospire de la souche Mar... (culture).*

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | | | CULTURE de la souche Mar... |
|------------------------------|--------------|---------|--------------------------------|
| Espèces | Souches | Titre | |
| <i>L. bataviae</i> | Van Thienen. | 500 000 | 100 000 |
| <i>L. bataviae</i> | Saigon W947. | 500 000 | 100 000 |
| <i>L. mitis</i> | Johnson. | 20 000 | 100 |

L'essai a été fait avec d'autres sérums agglutinants préparés avec les espèces suivantes : *L. ictero-hemorrhagiae* Verdun et Su..., *L. grippotyphosa*, *L. canicola*, *L. sejrae*, *L. pomona*, *L. ballum*, *L. bovis*. Toutes les réponses ont été négatives.

2° *Préparation d'un sérum anti-Mar...* — Le sérum agglutine la souche homologue jusqu'à 1/500 000.

3° *Essai d'agglutination de leptospires de diverses espèces par le sérum anti-Mar...*

| ESPÈCES | SOUCHES | SÉRUM agglutinant la souche Mar... à 1/500 000 |
|------------------------------|--------------|---|
| <i>L. bataviae</i> | Van Thienen. | 100 000 |
| <i>L. bataviae</i> | Saigon W947. | 500 000 |
| <i>L. mitis</i> | Johnson. | 100 |

Les sérums expérimentaux agglutinant *L. ictero-hemorrhagiae* (2 souches), *L. grippotyphosa*, *L. canicola*, *L. sejrae*, *L. pomona*, *L. ballum*, *L. bovis* ont donné des réponses négatives, de même que les sérums préparés avec les souches saigonaises Kéb... et Köl... (*L. canicola*).

La souche Mar..., isolée d'un cas de leptospirose à Saigon, est un *L. bataviae* qui présente des traces d'affinités avec *L. mitis* (coagglutinines faibles à 1/100). L'aspect morphologique est un peu différent de celui des leptospires en général à cause de la présence de formes effilées parmi les formes classiques recourbées aux deux extrémités ; cet aspect s'observe aussi dans les cultures de *L. bataviae* van Thienen. Le leptospire est peu virulent pour le cobaye : quelques animaux inoculés meurent (ictère, hémorragie, leptospires dans le foie), mais la plupart survivent, même sans présenter un clocher thermique au troisième-quatrième jour.

VII. *Souche Guy...*, isolée à l'Institut Pasteur de Saigon, en octobre 1950, par les D^{rs} P. de Lajudie et E. R. Brygoo.

Il s'agit d'un cas de leptospirose relativement bénigne (hôpital Grall, D^r de Jaureguiberry), anictérique, accompagnée d'une réaction méningée discrète. Le séro-diagnostic fut positif le douzième jour pour *L. bataviae*. Le malade avait été contaminé probablement par l'eau d'une rivière, près de Saigon.

Un cobaye inoculé avec 2 cm³ de sang du malade prélevé le sixième jour meurt le dixième jour : on note de l'ictère, des suffusions sanguines ; il y a des leptospires dans le foie. La culture du sang du cœur donne une souche de leptospires. Le passage à un second cobaye (broyat de foie et de rein) tue l'animal en cinq jours ; il y a un clocher à 40°2, les lésions sont les mêmes qu'après la première inoculation.

La souche fut envoyée à Paris en novembre 1950.

Pouvoir pathogène. — Deux cobayes ont reçu par voie intrapéritonéale 2 cm³ de culture. L'un est mort le soir du sixième jour (température, 40°4 le matin), l'autre est mort le dixième jour. Il n'y a pas d'ictère ; on note extérieurement des hémorragies nasale et buccale ; les lésions pulmonaires sont en taches caractéristiques d'une leptospirose expérimentale ; les suffusions sanguines sont importantes dans les régions inguinales et axillaires, au niveau des épидidymes. Malheureusement l'autopsie de ces deux cobayes n'a pu être faite que quelques heures après la mort et les examens microscopiques n'ont pas montré de leptospires.

La souche est donc virulente pour le cobaye qu'elle tue en cinq à dix jours ; elle a perdu rapidement son pouvoir ictérogène puisque les cobayes inoculés deux mois après l'isolement sont restés anictériques.

1° *Action de divers sérums anti-leptospires (sérums expérimentaux de lapins) sur le leptospire Guy... [culture]* (1^{er} tableau, p. 623).

L'essai a été fait avec d'autres sérums agglutinants préparés avec les espèces suivantes : *L. ictero-hemorrhagiae* (3 souches), *L. grippityphosa*, *L. canicola*, *L. sejræ*, *L. pomona*, *L. ballum*, *L. bovis*. Les résultats ont été négatifs.

2° *Préparation d'un sérum expérimental anti-Guy...* — Le sérum agglutine la souche homologue à 1/1 000 000.

3° *Essai d'agglutination de leptospires de diverses espèces par le sérum anti-Guy...* (2^e tableau, p. 623).

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | | | CULTURE |
|-----------------------------|---------------|-----------|---------------------|
| Espèces | Souches | Titre | de la souche Guy... |
| <i>L. bataviæ</i> | Van Thienen. | 500 000 | 500 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Saigon W 947. | 500 000 | 500 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Mar... | 1 000 000 | 500 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Sim... | 1 000 000 | 1 000 000 |
| <i>L. mitis</i> | Johnson. | 20 000 | 500 |

| ESPÈCES | SOUCHES | SÉRUM agglutinant la souche Guy... à 1/1 000 000 |
|-----------------------------|---------------|---|
| <i>L. bataviæ</i> | Van Thienen. | 500 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Saigon W 947. | 500 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Mar... | 500 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Sim... | 500 000 |
| <i>L. mitis</i> | Johnson. | 100 |

D'autres sérums agglutinant spécifiquement *L. ictero-hemorrhagiae* (3 souches), *L. grippo-typhosa*, *L. canicola* (3 souches, dont 2 saïgonnaises), *L. sejrae*, *L. pomona*, *L. ballum*, *L. bovis* sont sans action sur les cultures de la souche Guy...

La souche de leptospire Guy..., isolée d'un malade à Saigon, est un *L. bataviæ* qui donne de faibles coagglutinines pour *L. mitis*. Ce leptospire est pathogène pour le cobaye qui meurt en cinq à dix jours porteur de lésions hémorragiques étendues ; ictérigène immédiatement après l'isolement, la souche a perdu rapidement cette propriété.

Si *L. bataviæ* n'a reçu qu'en 1938 (Esseveld et Collier) ce nom qui marquait son individualité, des souches très voisines étaient connues depuis 1925 (Walch) et, depuis 1927, Walch et Soesilo le considéraient comme appartenant à une espèce nouvelle [25, 26]. Différentes souches ne sont que des variantes de l'espèce type. De nombreux auteurs ont rapporté, depuis 1932, des cas de cette maladie en Indonésie (Indonésien Weil's disease). Il serait inutile de rappeler ici la présence de *L. bataviæ* en Europe (rizières de l'Italie du Nord, Danemark, Suisse, Banat) et en Afrique Centrale s'il ne fallait mettre en évidence la répartition géographique, étendue sans doute mais encore mal connue, de cette espèce.

VIII et IX. Souches Mer... et Jac..., isolées à l'Institut Pasteur de Saigon, en avril 1951, par le Dr E. R. Brygoo.

Ces deux souches ont été obtenues de malades (hôpital Grall, Dr de Jaureguiberry) qui s'étaient contaminés dans les rizières au cours d'opérations militaires qui eurent lieu dans la région de Vinh-Long (Sud-Viet-Nam) et se terminèrent au début d'avril 1951. La maladie se déclara sept à dix jours plus tard. Ces deux souches doivent être étudiées ensemble et comparativement, car la conclusion des recherches pour l'identification montrera qu'elles sont semblables. La souche Mer... a été isolée d'un cas mortel de leptospirose avec ictère et hémorragies. Aucun séro-diagnostic ne fut fait. Un cobaye inoculé avec le sang du malade mourut ictérique entre le treizième et le quatorzième jour sans avoir présenté d'hyperthermie appréciable ; l'autopsie ayant été faite plusieurs heures après la mort, l'hémoculture donna une culture impure, mais l'inoculation du broyat du foie et celle de la culture impure permirent de faire par ponction du cœur de cobayes encore en vie des hémocultures qui donnèrent une souche de leptospires à l'état pur.

L'histoire de la souche Jac... est très particulière. Pour le malade, le diagnostic était celui de leptospirose ictéro-hémorragique grave, mais le séro-diagnostic fut toujours négatif pour *L. ictero-hemorrhagiae*. Un cobaye fut inoculé avec le sang de Jac... et resta en observation pendant un mois et huit jours, du 20 avril au 28 mai ; rien de spécial ne fut noté. Le 28 mai, le cobaye servit pour un autre essai : il reçut 1 cm³ d'une suspension de paracolibacille (pour contrôle de la virulence du germe). Ce cobaye mourut le quatorzième jour ; il présentait de l'ictère et l'on trouva des leptospires dans le foie à l'examen direct. Les cultures du sang du cœur permirent d'isoler une souche de leptospires qui tua le cobaye en cinq ou sept jours avec de l'ictère et des lésions pulmonaires en taches caractéristiques. L'histoire de la souche Jac... sera discutée plus loin. La souche Mer... fut envoyée à Paris en mai 1951, la souche Jac... en juillet.

Pouvoir pathogène. — a) Deux cobayes ont été inoculés par voie intrapéritonéale avec 2 cm³ de la culture Mer... ; l'un fut sacrifié en hypothermie, le soir du quatrième jour, ce qui permit de faire une hémoculture ; l'autre fut trouvé mort le matin du cinquième jour. Une température de 40°-40°2 a précédé la mort. Pour les deux on a noté un ictère flamboyant, des hémorragies sous-cutanées et internes dans toutes les localisations les plus classiques ; il y a des leptospires en petit nombre dans le foie et dans l'urine.

b) La souche Jac... a été inoculée à 2 cobayes par voie intrapéritonéale (1 cm³). La courbe thermique n'a pas été marquée par un clocher très apparent. Les animaux sont morts le cinquième jour, en hypothermie. L'ictère et les hémorragies sont les mêmes, quant à l'intensité et à l'étendue, que pour les cobayes inoculés avec la souche Mer...

c) Des Hamsters ont été inoculés avec les deux leptospires. Après l'injection par voie intrapéritonéale, ils sont morts le cinquième jour : pas d'ictère, pas d'hémorragies localisées, mais une congestion intense de tous les organes et de l'hématurie ; des leptospires dans le foie et dans l'urine.

Ces deux souches sont donc très virulentes, elles tuent le cobaye en cinq jours, les lésions hémorragiques et l'ictère sont semblables et très intenses. Elles sont aussi pathogènes pour le Hamster.

1° Action de divers sérums anti-leptospires (sérums expérimentaux de lapins) sur les souches Mer... et Jac... (cultures).

| SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX | | | CULTURES DES SOUCHES | |
|--|-----------|-----------|----------------------|-----------|
| Espèces | Souches | Titre | Mer... | Jac... |
| <i>L. australis</i> A | Ballico. | 1 000 000 | 1 000 000 | 1 000 000 |
| <i>L. bonis</i> | Olitzski. | 20 000 | 100 | 500 |
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> | Su... | 500 000 | | 100 |
| <i>L. bataviæ</i> | Guy... | 500 000 | 1 000 | |
| ? | Jaw-Jit. | 200 000 | 500 | 100 |

La recherche des agglutinines a été faite en présence des anti-sérums préparés avec les souches suivantes : *L. grippo-typhosa*, *L. ictero-hemorrhagiæ* (3 autres souches), *L. canicola* (2 souches), *L. pomona*, *L. mitis*, *L. bataviæ* (3 autres souches), *L. sejracæ*, *L. ballum*, *L. bovis*, *L. autumnalis*, *L. hebdomadis*, *L. pyrogenes* (2 souches), *L. pol.*, *L. saxkæbing*. Aucun de ces sérums n'a agglutiné ni l'une ni l'autre de ces deux souches.

2° Préparation de sérums agglutinant anti-Mer... et anti-Jac... — La limite de l'agglutination des leptospires de la souche Mer... par le sérum anti-Mer... est de 1/1 000 000. Le titre est le même pour les leptospires Jac... en présence du sérum anti-Jac... Le taux limite est également 1/1 000 000 pour l'agglutination des leptospires de la souche Mer... par le sérum anti-Jac... et des leptospires de la souche Jac... par le sérum anti-Mer... La lyse est encore sensible à 1/100 000.

3° Essai d'agglutination de leptospires de diverses espèces par les sérums anti-Mer... et anti-Jac...

| CULTURES | | SÉRUMS AGGLUTINANT AU 1/1 000 000 les souches | |
|--|----------------|--|-----------|
| Espèces | Souches | Mer... | Jac... |
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> | Kantorowicz A. | 1 000 | 1 000 |
| <i>L. ictero-hemorrhagiæ</i> | Su... A. | 1 000 | 1 000 |
| <i>L. canicola</i> | Kéb... | 100 | |
| <i>L. mitis</i> | Johnson. | 100 | 1 000 |
| <i>L. bataviæ</i> | Mar... | 1 000 | |
| <i>L. australis</i> | Ballico. | 1 000 000 | 1 000 000 |
| ? | Jaw-Jit. | 1 000 | 100 |
| ? | Djassiman. | 500 | 1 000 |
| ? | Naam. | 100 | 1 000 |

Pour d'autres cultures, l'agglutination par les sérums anti-Mer... et anti-Jac... a été recherchée : toutes les réactions ont été négatives. Les espèces et souches essayées sont les suivantes : *L. ictero-hemorrhagiae* (Verdun et Wijnberg A B), *L. grippo-typhosa* (2 souches), *L. canicola* (3 souches dont 2 vietnamiennes), *L. pomona*, *L. mitis*, *L. sejræ*, *L. bovis*, *L. autumnalis*, *L. hebdomadis*, *L. bataviae*, *L. pyrogenes* (2 souches), *L. javanica*, *L. schuffneri*, *L. saxkæbing*, *L. poi* ; *L. ballum*, *L. medanensis* (et souche Sarmin), les souches Rachmat, Sentot, trois souches de leptospires de la souris et quatre souches de leptospires aquicoles.

4° *Epreuve de saturation des agglutinines pour les deux sérums anti-Mer... et anti-Jac...* — Plusieurs essais de saturation des agglutinines ont été faits en présence de sérums dilués à des taux différents car les taux limite des sérums anti-Mer... et anti-Jac... étaient très élevés.

| SÉRUMS | CULTURE MER... | CULTURE JAC... |
|--|----------------|----------------|
| I. Anti-Jac... (1/50) saturé par Jac.... | 100 000 | 100 000 |
| Anti-Jac... (1/50) saturé par Mer... | 100 000 | 100 000 |
| II. Anti-Mer... (1/100) saturé par Mer.... | 20 000 | 20 000 |
| Anti-Mer... (1/100) saturé par Jac.... | 20 000 | 20 000 |
| III. Anti-Mer... (1/1 000) saturé par Mer... | > 10 000 | > 10 000 |
| Anti-Mer... (1/1 000) saturé par Jac.... | > 10 000 | > 10 000 |
| IV. Anti-Jac... pur. | 1 000 000 | 1 000 000 |
| Anti-Mer... pur. | 1 000 000 | 1 000 000 |

Les résultats obtenus, régulièrement comparables dans les 3 essais de saturation, l'identité des taux et la similitude de l'aspect microscopique des agglutinations montrent un parallélisme étroit entre les deux souches qui permet de les identifier l'une et l'autre.

5° *Recherche des coagglutinines de L. australis Ballico.* — Le sérum anti-*L. australis* Ballico qui a été préparé agglutine l'espèce à 1/1 000 000 ; il n'agglutine aucun des autres leptospires qui ont été essayés, sauf *L. ictero-hemorrhagiae* A Su... à 1/1 000 et *L. bataviae* Guy... à 1/1 000, soit deux souches isolées à Saigon.

6° *Comparaison des souches Mer... et Jac... et de L. australis par des épreuves de saturation.* — Les résultats obtenus dans les séries d'essais d'agglutination préliminaire (cultures en présence de sérums anti-

| SÉRUMS | | MER... | JAC... | <i>L. australis</i> |
|-------------------------|--|-----------|-----------|---------------------|
| Dilués à 1/1 000. | Anti-Mer... saturé par Mer. . | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 |
| | Anti-Mer... saturé par Jac... | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 |
| | Anti- <i>L. australis</i> saturé par <i>L. australis</i> . | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 |
| | Anti-Mer... saturé par <i>L. australis</i> . | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 |
| Purs. | Anti-Mer... | 1 000 000 | 1 000 000 | 1 000 000 |
| | Anti- <i>L. australis</i> . | 1 000 000 | 1 000 000 | 1 000 000 |

leptospirés ou sérums anti-Mer... ou anti-Jac... au contact de diverses cultures) ont montré que *L. australis* était le plus voisin des deux nouvelles souches, les autres espèces n'ayant donné que des taux sans signification valable ou des réponses négatives.

L'épreuve de saturation fut conduite de la même manière que pour l'identification des souches Mer... et Jac..., en partant de sérums dilués à 1/1 000.

Les deux souches de leptospirés Mer... et Jac..., isolées à Saigon, sont identiques entre elles. Elles sont pathogènes pour le cobaye qui meurt en cinq à sept jours, fortement ictérique, porteur d'hémorragies externes, sous-cutanées et intra-organiques.

Les cultures sont agglutinées à un titre élevé par le sérum anti-*L. australis* (1/1 000 000), elles donnent des coagglutinines à des taux faibles en présence des sérums anti-*L. bovis* (1/100 Mer..., 1/500 Jac...), anti-Jaw-Jit (1/500 Mer..., 1/100 Jac...); en présence du sérum anti-*L. ictero-hemorragiæ* A (1/100 Jac...) et du sérum anti-*L. bataviæ*, souche Guy... d'origine vietnamienne (1/100 Mer...).

Les sérums anti-Mer... et anti-Jac... agglutinent à un taux élevé la culture de *L. australis* (1/1 000 000). Des coagglutinines s'observent pour *L. ictero-hemorragiæ* A (1/1 000 Mer... et Jac...); *L. canicola* Kéb... (1/100 Mer...); *L. mitis* (1/100 Mer... et 1/1 000 Jac...); *L. bataviæ* souche vietnamienne Mar... (1/1 000 Mer...); souche Jaw-Jit (1/1 000 Mer..., 1/100 Jac...); deux souches indonésiennes Djassiman (1/500 Mer..., 1/1 000 Jac...) et Naam (1/100 Mer... et Jac...).

Des épreuves de saturation des agglutinines ont montré l'identité des leptospirés Mer... et Jac... et l'identité de ces deux souches à *L. australis* Ballico.

Les deux souches Mer... et Jac..., identifiées à l'espèce *L. australis*, furent en partie responsables de l'épidémie de leptospirose de 1951 au cours de laquelle elles furent isolées. La souche Mer... fut isolée sans complications et son histoire ne prête à aucune critique. Il n'en est pas de même pour la souche Jac... et l'on peut se demander si c'est elle qui avait infecté le malade dont elle porte le nom. Des cobayes inoculés avec les produits humains renfermant un petit nombre de leptospirés peu virulents meurent parfois après un mois, et les lésions peuvent ne pas être nettes. Ce temps de « survie » d'un mois huit jours pour la souche en question, auquel doivent encore être ajoutés quatorze jours après l'injection de paracolibacille, représente une durée d'incubation et de maladie qu'on ne peut admettre sans discussion. Ce leptospire isolé du cobaye est-il réellement celui qui avait infecté le malade? ou bien le cobaye a-t-il subi une contamination accidentelle de voisinage, peut-être d'origine alimentaire, ou par un autre rongeur : cobaye inoculé, rat ou souris porteurs de germes?

Une expérience avait été entreprise afin de rechercher la diffusion possible du leptospire par l'urine d'un rongeur inoculé. Malheureusement ces recherches ont été abandonnées involontairement, mais les premiers résultats obtenus doivent être retenus.

Deux souris sont inoculées le 11 août 1951 par voie intrapéritonéale avec 0,2 cm³ de culture Jac... Elles ne manifestent aucun symptôme de maladie, mais elles sont leptospiruriques vingt-cinq, quarante-six, cinquante-deux, soixante-dix jours après l'injection. L'urine des souris avait été examinée avant l'inoculation afin d'éliminer les porteuses éventuelles de *L. ballum*. Le cinquante-deuxième jour, un cobaye blanc reçoit par voie intrapéritonéale environ 0,15 cm³ d'urine recueillie sur les deux souris. Ce cobaye meurt douze jours après, anictérique, avec une légère hémorragie nasale ; il a, aux poumons, des suffusions hémorragiques qui caractérisent une leptospirose expérimentale et dans l'urine on trouve des leptospires. Ce n'était pas *L. ballum*, du reste non pathogène pour le cobaye, puisque les souris en étaient indemnes. Restait à chercher si le leptospire était celui de la souche Jac... L'hémoculture n'avait pas pu être faite, un broyage dans l'eau physiologique, des reins du cobaye fut inoculé à un animal neuf. Le cobaye était encore vivant quatorze jours après, mais l'expérience s'est trouvée interrompue.

Cependant un fait reste acquis ; la souris est porteuse de leptospires pendant longtemps — au moins soixante-dix jours — et l'urine peut, au cinquante-deuxième jour, donner une maladie expérimentale mortelle au cobaye. Il n'est pas interdit de penser que le cobaye, inoculé avec le sang du malade Jac... trop pauvre en leptospires pour être infectant à la fin de la période septicémique, n'a pas été vacciné par la première injection, mais qu'il a été contaminé par d'autres animaux porteurs de leptospires. On peut penser aussi que le cobaye inoculé est resté porteur de leptospires après une maladie inapparente, ou qu'il présentait une résistance particulière à cette infection. L'introduction d'un germe a déterminé un déséquilibre organique qui a permis l'infection par le leptospire présent dans l'organisme, mais inactif, ce qui expliquerait le délai de quatorze jours, durée possible de survie entre l'inoculation du paracolibacille et la mort.

L'intervention d'un rongeur porteur de germes qui aurait contaminé le cobaye ne peut pas être retenue. Les rongeurs libres sont rares dans le clapier et l'infection par un rat, une souris, est bien peu probable. Les cobayes injectés à cette époque à l'Institut Pasteur de Saigon pour la recherche des leptospires avaient été inoculés avec la souche Mer... Or, les deux souches Mer... et Jac..., si elles peuvent être identifiées l'une à l'autre, diffèrent légèrement quant à la présence de certaines coagglutinines. Et puisque ces leptospires peuvent vivre au moins soixante-dix jours dans l'organisme de la souris, pourquoi ne pourrait-il en être de même pour le cobaye si l'on admet que le sujet était plus résistant que d'autres à une leptospirose expérimentale ?

La souche Jac... est agglutinée par le sérum du malade Jac... à 1/100 000 et aussi par le sérum de beaucoup d'autres malades, comme la souche Mer... et son origine humaine ne doit pas être mise en doute.

Les souches saïgonnaises Mer... et Jac... ont été identifiées à l'espèce *L. australis* parce que les limites des taux d'agglutinations croisées entre les trois sérums expérimentaux et les trois cultures sont très voisines et que la saturation des agglutinines donne des réponses parallèles pour les trois souches. Mais, tandis que les sérums des malades agglutinent les leptospires Mer... et Jac... à 1/100 000, le taux ne dépasse guère 1/10 000 pour *L. australis* Ballico, souche de collection déjà ancienne. Ces deux souches ne peuvent pas être attribuées à une espèce nouvelle, elles ne peuvent être rapportées qu'à *L. australis* pour les raisons invoquées plus haut (3). Ces deux souches Mer... et Jac... représenteraient un type de l'espèce à antigène biologiquement un peu différent de celui de la souche Ballico. Les deux souches Mer... et Jac..., si elles sont identiques, ne le sont pas complètement quant à leur structure antigénique, elles possèdent des coagglutinines qui ne sont pas les mêmes ou au même taux pour chacune. Les trois souches Mer..., Jac... et Ballico ont en commun des coagglutinines pour des souches d'origine vietnamienne : une de *L. ictero-hemorragiæ* Su... A et deux de *L. bataviæ* Guy... et Mar...

L. australis, agent de la maladie des coupeurs de canne à sucre en Australie, de certains cas de leptospirose des travailleurs des rizières en Italie du Nord, existe dans la boue des rizières de Vinh-Long (Sud-Viet-Nam); en avril, saison des plus basses eaux, il a contaminé un grand nombre de sujets.

Rôle de l'eau et des porteurs de germes. — L'étude des leptospires devrait être complétée par la recherche et l'identification des leptospires de l'eau, par la détermination des rongeurs (rats et souris), par la mise en évidence de leptospires chez d'autres animaux (le chien en particulier) qui peuvent être porteurs de germes.

Rien n'a été cherché en Sud-Viet-Nam à propos des leptospires de l'eau.

Les travaux publiés sur les rats de cette région sont anciens (Krempf, 1911 [27]; Cadet, 1917 [28]; Bourret, 1927 [29]) et ne fournissent guère de renseignements utiles. L'étude faite en 1933, par Souchard [30], de la faune des rats de Saigon-Cholon avait été entreprise afin de rechercher les parasites de ces rongeurs et leur rôle dans la diffusion de la peste. Cependant, l'auteur signale *Mus decumanus*, *Mus alexandrinus*, le premier étant le plus communément répandu. De plus, Souchard avait mis en

(3) Depuis, ont été étudiés, en France, les sérums d'un bovidé et de chevaux qui agglutinaient *L. australis* Ballico et Mer... au même taux : 1/10 000.

évidence [10] la contamination des rats par *L. ictero-hemorragiae*, mais sans rapporter à une espèce déterminée les réponses positives.

Les livres d'Ellermann (1941 et 1947 [31]) renseignent sur les peuplements asiatiques ; ils groupent les espèces du genre *Rattus* que l'on trouve dans la région qui comprend le Siam et la péninsule Malaise. Il n'existe pas de travail d'ensemble sur les rongeurs du Sud-Viet-Nam. Certaines espèces de leptospires sont universellement connues parce que leur porteur a une répartition mondiale : c'est le cas de *Rattus norvegicus* et *Rattus alexandrinus* pour *L. ictero-hemorragiae*. Si, pour d'autres leptospiroses, d'abord connues dans un territoire limité, on établit une répartition de plus en plus étendue à mesure que progressent les études de ce groupe, on trouve que les rongeurs vecteurs ne sont pas seulement ceux qui ont été trouvés à l'origine, mais qu'il y a aussi adaptation à d'autres espèces, qui peuvent changer d'une contrée à l'autre et qui ne sont pas universellement réparties.

Le vecteur de *L. bataviae* n'est pas toujours le même. A Batavia, *Rattus norvegicus* est l'hôte principal des leptospires de cette espèce. Il peut être de même dans des régions où ce leptospire vit abondamment dans le milieu extérieur (eau, boue, vase de température et de pH convenables). Mais, ailleurs, il n'est pas le seul ou ce n'est plus lui qui dissémine l'espèce : ainsi, dans les rizières du Nord de l'Italie, c'est *Micromys minutus soricinus* qui s'est révélé vecteur actif. Dans la région de Saïgon, quelle espèce de rongeur, rat ou souris, est porteuse de *L. bataviae* et répand les germes virulents dans le milieu extérieur ? Actuellement la question est sans réponse. L'influence du chien n'est pas à écarter : des rats de leptospiroses à *L. canicola* ont été trouvés en Sud-Viet-Nam, or, le chien pouvant être porteur de *L. bataviae* [24], la contagion n'est pas impossible dans ce sens si des chiens de la région sont vecteurs de cette espèce. En tout cas, pour les cas qui sont signalés dans ce travail, Sim... habitait Saïgon et ne quittait pas la ville où les rats abondent dans certains quartiers ; Mar... et Guy... ont été contaminés par la boue des rizières dans la région de Saïgon : les modes de contamination les plus sûrs sont réunis.

Le rongeur reconnu porteur de *L. australis* en Australie est *Rattus culmorum*. Cependant, le rat de cette espèce ne semble pas exister en Sud-Viet-Nam, il fait partie d'un groupe d'espèces propres à l'Australie. Il faut donc admettre que là, comme en Italie du Nord à propos de *L. bataviae*, un rat d'une espèce différente, ou un autre rongeur, est vecteur du germe virulent.

Puisqu'une espèce de leptospire n'a pas toujours le même vecteur, il n'y a pas, entre l'hôte et le parasite, une adaptation

si étroite que la vie de ce dernier soit impossible s'il ne trouve pas son milieu vivant habituel. Ne pourrait-on pas expliquer par l'adaptation à des hôtes variés la différence entre les propriétés antigéniques de souches de diverses origines ou même d'espèces ayant d'étroites affinités ?

Interprétation des travaux antérieurs. — Faut-il penser qu'un rapprochement pourrait être fait entre des souches qui ont été isolées au Sud-Viet-Nam depuis 1947 et celles qui ont été trouvées par M. Vaucel au Tonkin mais non identifiées ?

La souche Kébler semble avoir une certaine parenté avec *L. autumnalis* ; coagglutinines à 1/1 000 avec un sérum anti-*autumnalis* ayant une limite à 1/100 000. La virulence pour le cobaye est faible : une période de fièvre, sans ictère ni hémorragie, suivie de guérison. Cependant, la souche avait été ictérogène pour l'homme. La souche Tuyen-Quang donne au cobaye des lésions hémorragiques et de l'ictère. L'histoire du malade n'est pas entièrement connue. Les coagglutinines sont faibles pour *L. ictero-hemorragiæ* et pour *L. autumnalis*. De plus ces deux souches étaient différentes entre elles, car leurs sérums expérimentaux respectifs ne donnaient pas d'agglutination croisée ; il n'y avait même pas de coagglutinines réciproques. Si certaines souches qui ont été isolées en Sud-Viet-Nam possèdent des coagglutinines pour *L. ictero-hemorragiæ* à un titre faible (1/1 000 pour Kéb..., Jac... et Mer...), aucune d'elles n'a de coagglutinines pour *L. autumnalis* et *L. hebdomadis*, même à 1/10 : c'est le principal argument contre un rapprochement entre ces souches et celles de M. Vaucel. Il est impossible de dire à quelles espèces de leptospires pouvaient appartenir ses souches et si elles étaient proches de celles qui ont été isolées à Saigon, la comparaison à trois espèces *L. ictero-hemorragiæ*, *L. autumnalis* et *L. hebdomadis* étant trop courte pour que la présence de coagglutinines puisse guider vers une espèce peu utilisée en 1936 ou inconnue. Il est très regrettable que les deux souches isolées par M. Vaucel n'aient pas été conservées, car elles représentaient la base des recherches sur les leptospires du Nord-Viet-Nam et leur comparaison aux souches du Sud-Viet-Nam aurait été pleine d'intérêt.

RÉSUMÉ. — De 1947 à 1951, plusieurs souches de leptospires ont été cultivées à l'Institut Pasteur de Saigon. De cas isolés ou d'épidémies, des souches ont été obtenues : 1 de *L. ictero-hemorragiæ* A, 2 de *L. canicola*, 4 de *L. bataviæ*, 2 de *L. australis*. Ces trois dernières espèces n'étaient pas connues en Sud-Viet-Nam.

Aucune recherche n'a pu être faite au sujet des vecteurs de ces espèces. Le chien peut être porteur de toutes les espèces isolées ; son rôle mériterait d'être précisé.

L. bataviæ peut être transmis par *Rattus norvegicus* dont on

connait la présence en Sud-Viet-Nam, mais il n'est pas impossible qu'il soit hébergé par un autre rongeur.

L. australis doit être l'hôte d'une espèce non encore déterminée en Sud-Viet-Nam, mais qui sera probablement différente du rat australien *Rattus culmorum*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAVAU, CH. RAGIOT, SOUCHARD, FARINAUD et LIEOU. *Bull. Soc. path. exot.*, 1931, **24**, 440.
- [2] CH. RAGIOT et P. DELBOVE. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1933, **24**, 16.
- [3] CH. RAGIOT et P. DELBOVE. *Bull. Soc. path. exot.*, 1934, **27**, 347.
- [4] CH. MASSIAS. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1935, **26**, 788.
- [5] CH. MASSIAS. *Bull. Soc. path. exot.*, 1935, **28**, 791.
- [6] CH. RAGIOT, P. DELBOVE, NGUYEN VAN HUONG et HO THIEU NGAN. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1935, **26**, 817.
- [7] CH. RAGIOT, MOREAU et NGUYEN VAN HUONG. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1936, **27**, 361.
- [8] NGUYEN DINH HAO. *Rev. méd. franç. d'Extrême-Orient*, 1938, **16**, 58.
- [9] P. ROUSSET. *Médecine tropicale*, 1949, **9**, 349.
- [10] SOUCHARD. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1933, **24**, 11.
- [11] M. VAUCEL. *Bull. Soc. path. exot.*, 1936, **29**, 251.
- [12] M. VAUCEL. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1936, **14**, 1115.
- [13] M. VAUCEL. *Bull. Soc. path. exot.*, 1937, **30**, 176.
- [14] M. VAUCEL. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1936, **28**, 385.
- [15] A. BIGOT. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1936, **27**, 1132.
- [16] M. VAUCEL et R. SOULIER. *Bull. Soc. path. exot.*, 1937, **30**, 408.
- [17] M. VAUCEL. *Arch. des Instituts Pasteur d'Indochine*, 1937, **7**, 137.
- [18] Rapports annuels de l'Institut Pasteur de Saigon.
- [19] L. MARTIN, A. PETTIT et A. VAUDREMER. *C. R. Soc. biol.*, 1917, **80**, 949. — B. ERBER. *C. R. Soc. biol.*, 1935, **120**, 618. — A. PETTIT et B. ERBER. Congrès international de pathologie comparée, Athènes, avril 1936.
- [20] R. GISPEN et W. SCHUFFNER. *Zentralbl. Bakt. Orig.*, 1939, **144**, 427.
- [21] W. SCHUFFNER et H. BOHLANDER. *Zentralbl. Bakt. Orig.*, 1939, **144**, 434.
- [22] J. SNAPPER, H. J. CHUNG, I. CHU et K. CHEN. *Chi. Med. Journ.*, 1940, **58**, 408.
- [23] S. YAMAMOTO. *Japan. Journ. Veter. Sci.*, 1940, **138**, 474. — S. YAMAMOTO. *Zentralbl. Bakt.*, Ref. 1940, **138**, 474.
- [24] J. W. WOLFF, S. LOMAN et A. B. WIELENGA-BERGMAN. *Doc. Neerl. et Indon. de Morbis trop.*, 1951, **3**, 187.
- [25] Voir P. H. VAN THIEL. *The Leptospiroses*. University Pers., Leiden, 1948.
- [26] O. GSELL. *Leptospirosen*. Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern, 1952.
- [27] A. KREMP. *Bull. Econ. Sud.*, 1911, 236.

- [28] J. CADET. *Bull. Soc. path. exot.*, 1917, **10**, 41.
- [29] A. BOURRET. La faune d'Indochine. Vertébrés, 3^e fascicule. Soc. Géo. Hanoi, 1927.
- [30] SOUCHARD. *Bull. Soc. méd.-chir. de l'Indochine*, 1933, **24**, 60.
- [31] J. R. ELLERMANN. The families and genera of living rodents. *British Museum*, 1941, **2**; Notes on some Asiatic Rodents in the *British Museum*. P. Z. S., 1947, **117**, 259.

**ESSAIS COMPARATIFS SUR LA VIRULENCE
POUR *BOMBYX MORI* L (LEPIDOPTERA)
DE DIVERS BACILLES ENTOMOPHYTES
DU GROUPE *CEREUS***

par C. TOUMANOFF et C. VAGO (*).

(Institut Pasteur de Paris et Station
de Recherches Séricicoles d'Alès, I. N. R. A.)

Bacillus cereus var. *alesti* Toumanoff et Vago que nous avons décrit antérieurement et qui provoque une forme de flacherie infectieuse dans la région des Cévennes [14, 15, 16] se rattache à un groupe de microbes sporogènes se ressemblant quant à leur position systématique et leur virulence vis-à-vis de divers insectes.

Bacillus sotto (Ishiwata) a causé une maladie du ver à soie au Japon décrite par Ishiwata puis par Aoki et Chigasaki [1, 2].

Cette maladie, quant à sa pathogénie, ressemble fortement à l'affection due au *Bacillus cereus* var. *alesti* et présente des symptômes correspondant à ceux des flacheries.

En ce qui concerne la position systématique de *B. sotto*, une étude antérieure a permis d'établir l'appartenance de ce microbe au groupe *cereus* avec les différences que nous venons de définir entre celui-ci et *B. cereus* var. *alesti* :

B. cereus var. *alesti* se présente dans les cultures pures sur gélose ordinaire sous forme de bâtonnets, tandis que *B. sotto* a un aspect souvent filamenteux.

B. sotto liquéfie la gélatine assez rapidement, *B. cereus* var. *alesti* provoque une liquéfaction beaucoup plus lente.

La gélose glucosée au rouge neutre présente une fluorescence très nette dans le cas de *B. sotto* ; ce milieu, malgré une croissance marquée du *B. cereus* var. *alesti* ne se modifie pas, tout en produisant des gaz.

Sur pomme de terre, le *B. cereus* var. *alesti* donne un enduit blanc devenant rouge, puis brique, alors que le *B. sotto* donne un enduit blanc terne sans pigmentation apparente.

Le lait tournesolé est digéré par *B. sotto* sans modification de teinte, alors que le *B. cereus* var. *alesti* le fait virer au mauve. Aucune modification n'est observée dans le petit-lait tournesolé ensemencé de

(*) Société française de Microbiologie, séance du 3 juillet 1952.

B. cereus var. *alesti*, alors que ce même milieu se décolore sous l'action de *B. sotto* pour reprendre ultérieurement sa teinte primitive.

Le *B. sotto* forme une pellicule sur le milieu eau peptonée-haricot saccharosée, alors que le *B. cereus* var. *alesti* pousse en abondance sur le même milieu, sans former de pellicule.

Enfin, dans le sérum coagulé, légèrement liquéfié par *B. sotto*, *B. cereus* var. *alesti* pousse abondamment, mais ne le digère pas, tout en provoquant un léger changement de teinte.

Ces caractères permettent déjà de différencier les deux formes de bacilles : on doit les classer dans le groupe *cereus*, car tous deux réduisent les nitrates en nitrites, sont anaérobies facultatifs, poussent très mal sur le milieu de Grelet et forment de l'acétylméthylcarbinol.

Toumanoff [12] a suggéré que *B. sotto* (Ishiwata) devrait être considéré non pas comme étant une espèce bactérienne spéciale, mais comme une variété de *Bacillus cereus* Frankland et Frankland et l'a désigné sous le nom de *Bacillus cereus* var. *sotto*.

B. thuringiensis Berliner présente certaines affinités avec *B. sotto* et a été signalé à plusieurs reprises comme pathogène pour les insectes. Deux souches sont principalement connues, l'une d'origine allemande et l'autre d'origine française [3, 4, 5, 6, 7, 8].

Un autre bacille, *Bacillus laterosporus* Laubach, rencontré dans le sol et dans les larves d'abeilles atteintes de la loque européenne (Syn. : *Bacillus orpheus* White), a été signalé comme étant virulent pour les vers à soie (1) [10].

La ressemblance de ces souches au point de vue position systématique et leur virulence pour le même groupe d'Arthropodes (Lépidoptères) nous a amenés à étudier sur elles le problème si mal élucidé de la spécificité de la virulence au sein d'un groupe.

En raison de l'intérêt spécial pour l'épizootologie séricicole d'une telle comparaison, nous avons exécuté nos essais comparatifs sur les larves de *Bombyx mori* L.

Les expériences d'infection ont été effectuées avec des souches cultivées sur gélose ordinaire de pH 7-7,2 ; nous avons employé aussi bien des cultures jeunes, ne contenant pas ou très peu de spores, que des cultures âgées avec sporulation intense, mais afin de donner une base précise de comparaison, nous interprétons uniquement les contaminations par cultures âgées de quarante-huit heures à 32° C.

Pour réaliser l'infection *per os*, les feuilles de mûrier ont été immergées dans des suspensions bactériennes aqueuses, les vers étant maintenus à jeun pendant six heures avant de recevoir la suspension bactérienne.

(1) La souche de *Bacillus laterosporus* Laubach utilisée dans nos expériences était isolée par l'un de nous du venin des abeilles et était décrite ailleurs [13].

La concentration des suspensions bactériennes a été déterminée en utilisant comme test les dilutions des doses virulentes des cultures de *B. cereus* var. *alesti*, de façon à n'employer que dans une série d'essais la dose de 1 anse de culture dans 10 cm³ d'eau, dose à virulence moyennement forte. Dans les autres séries, une dose dix fois plus forte a été employée afin de pouvoir déceler la présence d'une virulence inférieure à celle de *B. cereus* var. *alesti*. Les essais ont été effectués simultanément sur des larves de 2°, 4° et 5° âges, afin de constater une différence de virulence selon les âges.

Parmi les essais réalisés dans les conditions ci-dessus et répétés onze à dix-sept fois (selon les séries), nous présentons dans les tableaux suivants trois essais caractéristiques concernant chaque souche dans chacune des séries.

TABLEAU I. — Lots de 50 chenilles au deuxième âge. Roustan, $t = 23^{\circ} \text{C}$, $h = 65 + 3.4 \text{ p. } 100$. Matière infectieuse dispersée sur les feuilles; suspension dans 10 cm³ de 10 anses de cultures sur gelose nutritive de pH 7,2; cultures âgées de quarante-huit heures à 32° C (forte sporulation).

| souches | Mortalité des chenilles (indications en heures) | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|----|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 16 | 24 | 48 | 72 |
| <u>B.sotto</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | I |
| <u>B.cereus var. alesti</u> | 0 | I | 6 | 6 | 9 | 10 | 6 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.thuringensis</u> (Allemand) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B. thuringensis</u> (Français) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.laterosporus</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nous voyons que les cinq souches expérimentées se comportent d'une façon différente vis-à-vis des larves qui les ingèrent dans des conditions identiques.

Le *Bacillus cereus* var. *alesti* s'est montré très pathogène *per os* pour les vers à soie de tous âges, provoquant une mortalité très rapide d'un pourcentage très élevé.

Bacillus sotto n'a provoqué qu'une mortalité réduite et tardive, avec arrêt immédiat. En effet, on observe 1 à 3 morts au bout de quarante-huit à soixante-douze heures. Dans certains lots il n'y a même aucune mortalité.

Dans les lots infectés par la souche *B. thuringiensis* Berliner d'origine allemande, nous constatons une mortalité tardive et limitée sur 1 à 4 individus.

TABLEAU II. — Lots de 50 chenilles au quatrième âge. Roustan, $t = 22^{\circ} \text{C}$, $h = 65 + 3-4$ p. 100. Matière infectieuse dispersée sur les feuilles: suspension dans 10 cm^3 d'eau de 1 anse de cultures sur gélose nutritive pH 7.2, cultures âgées de quarante-huit heures à 32°C (forte sporulation).

| souches | Mortalité des chenilles (indications en heures) | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 16 | 24 | 48 | 72 |
| <u>B.sotto</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.cereus var.alesti</u> | 0 | 0 | 2 | 2 | 5 | 7 | 6 | 4 | 5 | 5 | 3 | 4 | 4 | I | 2 |
| <u>B.thuringensis</u> (Allemand) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.thuringensis</u> (Français) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.laterosporus</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

TABLEAU III. — Lots de 50 chenilles au quatrième âge. Roustan, $t = 22^{\circ} \text{C}$, $h = 65 + 5-4$ p. 100. Matière infectieuse dispersée sur les feuilles: suspension dans 10 m^3 d'eau de 10 anses de cultures sur gélose nutritive pH 7.2; cultures âgées de quarante-huit heures à 32°C (forte sporulation).

| souches | Mortalité des chenilles (indications en heures) | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 16 | 24 | 48 | 72 |
| <u>B.sotto</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.cereus alesti</u> | 0 | 5 | 8 | 8 | I2 | 7 | 9 | I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.thuringensis</u> (Allemand) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.thuringensis</u> (Français) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>B.laterosporus</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Aucune mortalité n'a été obtenue dans les essais faits dans les mêmes conditions avec *B. thuringiensis* isolé en France par Métalnikov et Chorine, ni dans ceux faits avec *Bacillus laterosporus*.

La virulence très faible du *B. sotto* (Ishiwata) pour les vers à soie de France constatée dans nos essais est extrêmement intéressante, car la souche de *Bacillus sotto* que nous avons utilisée est, d'après les indications reçues du Japon, celle qui provoque dans ce pays la mortalité des vers à soie dans les magnaneries et aussi dans les conditions expérimentales.

TABLEAU IV. — Lots de 50 chenilles au cinquième âge. Roustan, $t = 22^{\circ} \text{C}$, $h = 65 + 3-4$ p. 100. Matière infectieuse dispersée sur les feuilles : suspension dans 10 cm³ d'eau de 10 anses de cultures sur gélose nutritive pH 7.2, cultures âgées de quarante-huit heures à 32°C .

| souches | Mortalité des chenilles (indications en heures) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 16 | 24 | 48 | 72 | |
| <u>B. sotto</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <u>B. cereus alesti</u> | 0 | 2 | 4 | 2 | II | IO | IO | II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <u>B. thuringiensis</u> (Allemand) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <u>B. thuringiensis</u> (Français) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <u>B. laterosporus</u> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

D'autre part, la souche *B. thuringiensis* Berliner est également celle dont la virulence fut éprouvée par Steinhaus contre la coliadé de la luzerne (*Colias philodice eurythème* Boisduval), aussi bien dans les conditions de laboratoire que dans la nature. Cette même souche était pathogène d'après Mattes pour *Ephestia kühniella*, et c'est du reste ce dernier auteur qui, par l'intermédiaire de N. Smith l'a remise au Dr Steinhaus.

Steinhaus, en expérimentant neuf souches de *B. cereus* de provenances variées (sol et autres origines) sur les chenilles de *Colias*, a constaté qu'elles étaient sans effet sur cet insecte et que seul *B. thuringiensis* les tuait, tant au laboratoire que dans la nature.

Enfin, la souche de *B. thuringiensis* de Métalnikov et Chorine est celle dont l'effet pathogène a été prouvé par ces auteurs sur la teigne de la farine (*Ephestia kühniella*) et la pyrale du maïs [*Pyrausta nubilalis* Hübn] (2).

En conclusion, nos expériences démontrent que parmi les bacilles du groupe *cereus*, même les souches reconnues pathogènes pour certains Lépidoptères ne le sont pas ou peu pour d'autres espèces du même groupe.

Ce groupe de bacilles comporte des formes tout à fait similaires quant à leurs caractères biochimiques, mais dont l'effet

(2) Les essais mentionnés sur ces tableaux se rapportent à la race Roustan, mais de très nombreuses expériences ont été faites également sur les vers d'autres races et ont donné des résultats à peu près analogues.

pathogène sur une même espèce d'insectes peut être extrêmement variable, aussi bien en ce qui concerne la rapidité d'action que l'intensité de l'effet morbide et léthal.

Sur le plan général de la pathologie des insectes, on doit retenir que l'affinité d'un groupe systématique de microbes vis-à-vis d'un groupe systématique d'animaux n'est que très grossière. Au sein des groupes existent les plus grandes variations, depuis la plus haute virulence jusqu'à l'absence de virulence.

Pour la pathologie séricicole, la haute virulence de *B. cereus* var. *alesii* Toumanoff et Vago vis-à-vis de *Bombyx mori* L par rapport à toutes les autres souches étudiées explique le rôle particulier de ce microbe dans l'épizootologie des « Flacheries ».

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AOKI (K.) et CHIGASAKI (Y.). *Mitt. des Med. Fakul. der Kaiser. Univers. zu Tokyo*, 1915, **3**, 419.
- [2] AOKI (K.) et CHIGASAKI (Y.). *Bull. of Imper. Sericul. Experim. Station near Nakano, Tokyo*, 1916, **1**, 141.
- [3] CHORINE (V.). *Internat. Corn. Borer. Invest. Sci. Rpts*, 1930, **3**, 94.
- [4] CHORINE (V.). *Ces Annales*, 1931, **46**, 326.
- [5] ELLINGER (T.) et CHORINE (V.). *Internat. Corn. Borer. Invest. Sci. Rpts*, 1930, **3**, 37.
- [6] METALNIKOV (S.) et CHORINE (V.). *Internat. Corn. Borer. Invest. Sci. Rpts*, 1929, **2**, 54.
- [7] METALNIKOV (S.) et CHORINE (V.). *Internat. Corn. Borer. Invest. Sci. Rpts*, 1939, **60**, 1.
- [8] METALNIKOV (S.) et CHORINE (V.). *Ces Annales*, 1929, **43**, 1391.
- [9] STEINHAUS (E.). *Insect Microbiology*, N. Y., 1947.
- [10] STEINHAUS (E.). *Principles of Insect Pathology*, N. Y., 1949.
- [11] STEINHAUS (E.). *Hilgardia*, 1951, **20**, 359.
- [12] TOUMANOFF (C.). *Ces Annales*, 1952, **82**, 512.
- [13] TOUMANOFF (C.). *Rev. Franç. Apicult.*, n° spécial 1951, 325 p.
- [14] TOUMANOFF (C.) et VAGO (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1504.
- [15] TOUMANOFF (C.) et VAGO (C.). *Ces Annales*, 1952, **83**, 421.
- [16] VAGO (C.). *C. R. Acad. Agric.*, 1951, **37**, 593.

INFLUENCE DE L'HYALURONIDASE SUR LES PROPRIÉTÉS THÉRAPEUTIQUES DU SÉRUM ANTIVENIMEUX

par P. BOQUET, A. BUSSARD et Y. IZARD
(avec la collaboration technique de D. LESIMPLE).

(Institut Pasteur. Garches.)

Les expériences que nous résumons dans ce mémoire ont été faites dans le dessein de déterminer dans quelle mesure l'hyaluronidase influe sur les propriétés thérapeutiques du sérum antivenimeux.

L'injection de cet immunsérum, par la voie veineuse, offre l'avantage d'amener rapidement les anticorps au contact du venin, mais elle présente des inconvénients qui limitent son emploi, entre autres : le danger qu'elle constitue pour les sujets allergiques aux protéines sériques étrangères, et les difficultés d'ordre pratique qu'elle soulève. On a recours, de préférence, à l'injection sous-cutanée, plus facile sans doute, mais moins efficace en raison de la lenteur avec laquelle le sérum se résorbe sous la peau. En effet, la « substance fondamentale » du tissu conjonctif retarde le cheminement des liquides vers les vaisseaux lymphatiques et les capillaires sanguins. L'acide hyaluronique en est une des principales causes [1], mais ce mucopolysaccharide peut être fluidifié *in situ* par des enzymes microbiens [2] ou testiculaires [3] : les hyaluronidases. L'hydrolyse de l'acide hyaluronique par ces enzymes augmente la perméabilité du tissu conjonctif et favorise la dispersion des substances injectées sous la peau.

Dès 1928, onze ans avant l'isolement d'une hyaluronidase à l'état pur, F. Duran Reynals [4] découvre « les facteurs de diffusion » dans les broyats de testicules. D. McLean et M. Morgan [5] démontrent, en 1933, que l'extrait testiculaire augmente la vitesse de passage du sérum antidiphtérique dans le sang du cobaye.

Plus près de nous, divers expérimentateurs associent l'hyaluronidase à des substances médicamenteuses [6], à des anesthésiques [7, 8] et aux solutions physiologiques qu'ils injectent pour prévenir le choc [9, 10, 11, 12, 13, 14 et 15].

En nous fondant sur les résultats de ces observations, nous avons entrepris de comparer, sur des cobayes expérimentalement envenimés, les effets de l'injection sous-cutanée d'un sérum antivenimeux tel quel, à ceux du même sérum associé à l'hyaluronidase, de mesurer parallèlement la vitesse de passage des anticorps antivenimeux dans le sang ; enfin, d'étudier dans les mêmes conditions les réactions anaphylactiques des animaux d'expérience, lorsqu'ils ont été rendus allergiques aux protéines du sérum de cheval par les méthodes habituelles de sensibilisation.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES. — 1° L'hyaluronidase est extraite des testicules de taureaux. Elle est purifiée suivant la technique de R. Tint et G. Bogash [46]. Après avoir été broyée, la glande fraîche est épuisée par l'acide acétique. Par des précipitations successives par le sulfate d'ammonium, puis par l'éthanol à basse température, on obtient un produit dont le degré de pureté est satisfaisant.

Deux méthodes sont employées pour titrer son activité : l'une, la méthode chimique, assez sensible, repose sur la propriété que possède l'hyaluronidase d'empêcher l'opacification *in vitro* des mélanges d'acide hyaluronique et de sérum ; l'autre, la méthode physiologique, est fondée sur l'accroissement, sous l'influence de l'enzyme, de la vitesse de dispersion de particules colorées injectées dans la peau.

Les résultats des dosages par la première de ces méthodes (« Turbidity reducing method » [47, 48] des expérimentateurs américains) sont assez inconstants. Ils varient à mesure que le substrat vieillit. Ils varient également avec l'âge et l'origine du sérum ; d'autre part, ils ne sont pas toujours comparables d'un laboratoire à un autre. Pour toutes ces raisons, nous donnons une définition relative du pouvoir « réducteur » de l'enzyme, en comparant l'activité du produit dont nous disposons à celle d'un enzyme purifié d'origine américaine : l'hyaluronidase des laboratoires Wyeth (lot 216-1), dont 1 mg contient 1 300 T. R. U. [Turbidity Reducing Unit] (1).

Pour titrer selon la méthode physiologique [49], on prélève de larges fragments de peau soigneusement épilée, sur les flancs de lapins sacrifiés par une saignée à la carotide, puis on étale chaque fragment sur une plaque de verre. Dans le derme ainsi préparé, on injecte des mélanges composés de 0,1 cm³ d'encre de Chine au 1/10 et d'un volume égal d'hyaluronidase à la concentration désirée ou de solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100. Chaque mélange est injecté en six points différents. Dans ces conditions, l'augmentation moyenne de la surface des taches d'encre observées par transparence exprime l'activité diffusante de l'enzyme.

Celle de l'hyaluronidase que nous préparons est égale à la moitié de l'activité de l'enzyme étalon « Wyeth ».

(1) Nous exprimons tous nos remerciements au Dr J. Seifter, directeur du « Wyeth Institute for Applied Biology » (Philadelphie), qui a bien voulu mettre à notre disposition les quantités d'hyaluronidase et d'acide hyaluronique nécessaires aux titrages de notre enzyme.

2° Le venin que nous employons est un mélange homogène des récoltes faites à Saigon au cours des années 1934, 1935 et 1936. Il représente le contenu des glandes venimeuses de plusieurs centaines de Cobra d'Indochine (*Naja tripudians*). Conservé à + 4°, sa toxicité ne varie pas : à la dose de 12,5 µg, par la voie veineuse, il tue en quelques heures la souris de 20 g.

Notre sérum antivenimeux étalon (sérum antivenimeux « C ») est un mélange de deux échantillons de sérum de chevaux hyperimmunisés par des injections intramusculaires de venin de Cobra (*Naja tripudians*). Il neutralise dans les conditions définies par Ipsen [20] 1 mg de venin à la dose de 0,9 cm³.

3° L'étude comparative de l'action curative de ce sérum, tel quel ou additionné d'hyaluronidase, est faite sur des cobayes de 350 à 400 g.

Cent quatre-vingts de ces rongeurs, mâles et femelles, sont répartis en deux lots. Ils reçoivent sous la peau de la cuisse droite, les uns une injection de 0,2 cm³, les autres une injection de 0,3 cm³ d'une solution à 1 p. 1 000 de venin de Cobra, soit 2 à 3 doses mortelles. Vingt à quarante-cinq minutes plus tard, on injecte sous le volume de 1,5 cm³, dans le tissu cellulaire de l'abdomen des cobayes du premier lot, 0,5 cm³ ou 0,75 cm³ de sérum antivenimeux dilué dans la solution physiologique de chlorure de sodium. Dans les mêmes délais, toutes les conditions étant égales, on injecte aux animaux du second lot les mêmes doses de sérum mélangées extemporanément à 200 µg d'hyaluronidase, puis on suit, heure par heure, la mortalité.

4° Afin de préciser l'influence de l'hyaluronidase sur la vitesse de passage des anticorps antivenimeux dans le sang, on administre à 30 cobayes, par piqûre de la peau du ventre, 2 cm³ de l'immunsérum « C » tel quel et, dans les mêmes conditions, à 30 autres cobayes, 2 cm³ du même immunsérum mélangé à 200 µg de cet enzyme. On saigne ensuite tous les animaux à la carotide, après quarante-cinq, quatre-vingt-dix, cent vingt et cent quatre-vingts minutes. On recueille séparément leur sérum ; on le chauffe pendant vingt minutes à 56° pour en inactiver l'alexine et la thrombine ; enfin, on titre par divers procédés ses activités antitoxiques ou antienzymatiques.

La technique classique qui consiste à éprouver sur la souris la toxicité des mélanges, en proportions variables, de venin et de sérum, n'est pas assez sensible pour permettre de déceler de très petites quantités d'anticorps. D'autre part, il n'est pas possible de mesurer *in vitro* l'action antagoniste des anticorps antivenimeux sur les propriétés hémolytiques et anticoagulantes du venin de Cobra en raison de l'action propre du sérum de cobaye. Nous avons été amenés à choisir une méthode de titrage fondée sur une observation de C. Delezenne et S. Ledebt [21], récemment développée par P. Boquet, M. Dworetzky et H. E. Essex [22]. Nous en résumons ci-dessous les principes essentiels :

A doses inoffensives pour les petits rongeurs, le venin de Cobra produit aux dépens du jaune d'œuf une substance toxique ; lorsqu'on injecte, par la voie veineuse, au cobaye ou au lapin, un mélange de ces deux réactifs, on provoque un « choc » comparable au choc anaphylactique dont le principal symptôme, chez le lapin, est une chute rapide de la pression artérielle.

Le sérum antivenimeux se comporte différemment suivant qu'on

l'ajoute à un mélange devenu toxique ou à un mélange fraîchement préparé dépourvu de nocivité. Dans le premier cas, il est sans effet ; dans le second, il neutralise le venin et le rend impropre à la production de la substance hypotensive.

Pour connaître le titre du sérum dont nous disposons, nous déterminons dans une première expérience la plus petite dose de ce sérum qui neutralise 10 μ g de venin de Cobra dans les conditions suivantes :

A 0,1 cm^3 d'une solution de venin à 1 p. 10 000, on ajoute des quantités décroissantes de sérum antivenimeux (0,01 cm^3 à 0,0005 cm^3) diluées dans 3,5 cm^3 de sérum normal de cobaye et 10 cm^3 d'une émulsion de jaune d'œuf obtenue en agitant pendant quelques secondes 40 cm^3 de vitellus et 60 cm^3 de solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100. On porte alors ces mélanges à 50° pendant deux heures, puis on les injecte par la voie veineuse à des lapins de 2 500 g environ dont on enregistre, à la carotide, les variations de la pression sanguine au moyen d'un manomètre de Ludwig. A la dose de 1,25 cm^3 par kilogramme, les préparations où le venin a été neutralisé sont inoffensives.

Dans une seconde expérience, toutes les conditions de la première expérience étant respectées, on substitue aux mélanges de sérum antivenimeux de cheval et de sérum normal de cobayes, des volumes décroissants (3,5, 2 et 1 cm^3) de chacun des 10 échantillons de sérum de cobayes prélevés trente, soixante, cent vingt et cent quatre-vingts minutes après l'injection sous-cutanée d'immunsérum, puis on procède à la mesure des variations de la pression carotidienne chez le lapin.

5° Enfin, dans le dessein d'étudier les réactions des animaux allergiques aux protéines du sérum de cheval, 58 cobayes sont répartis en deux lots. Les 28 cobayes du premier lot sont sensibilisés activement par deux injections intrapéritonéales, à vingt-quatre heures d'intervalle, de 1 à 2 cm^3 de sérum de cheval. Aux 30 cobayes du second lot, on confère l'hypersensibilité à l'égard des mêmes protéines par une injection intraveineuse, ou intrapéritonéale, de 1 ou 2 cm^3 d'un immunsérum de lapin anti-sérum de cheval. Dix-sept jours après la dernière injection d'antigène, ou vingt-quatre heures après la transmission de la sensibilité anaphylactique par l'immunsérum de lapin, tous ces cobayes sont éprouvés par une injection déchaînante, intraveineuse ou sous-cutanée, de sérum de cheval. L'injection dans la veine est destinée à mesurer le degré de la sensibilité anaphylactique ; l'injection sous la peau, à comparer les effets du sérum tel quel à ceux du sérum associé à l'hyaluronidase.

RÉSULTATS. — 1° *Influence de l'hyaluronidase sur l'action thérapeutique du sérum antivenimeux.* — Il ressort des observations groupées dans le tableau I que l'hyaluronidase augmente l'efficacité du sérum antivenimeux.

Les cobayes supportent deux doses mortelles de venin de Cobra lorsqu'on leur injecte, trente minutes plus tard, un mélange de 0,75 cm^3 de sérum anticobraïque et de 200 μ g d'hyaluronidase. Dans les mêmes conditions, mais en l'absence d'hyaluronidase,

TABLEAU I.

| Sérum | Numéro des expé- riences. | Nombre des co- bayes. | Doses de venin de Cobra en mg. | Doses de sérum anti- veni- meux. en cm ³ | Doses d'hya- luroni- dase. en μ g. | Délais de l'injec- tion. en min. | Mortalité | | | | Survies % |
|--|---------------------------------|-----------------------------|---|---|--|--|---------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| | | | | | | | I à 2h. | 2 à 3h. | 3 à 6h. | 6 à 24h. | |
| Sérum tel quel | 1 | 10 | 0,2 | 0,75 | 0 | 30 | | | 3 | | 70 |
| | 2 | 20 | 0,3 | 0,75 | 0 | 30 | 2 | 4 | 4 | | 50 |
| | 3 | 10 | 0,3 | 0,50 | 0 | 30 | 1 | 3 | 2 | | 40 |
| | 4 | 20 | 0,3 | 0,75 | 0 | 45 | 5 | 7 | 4 | | 20 |
| Sérum + Hyalu- roni- dase. | 1 | 10 | 0,2 | 0,75 | 200 | 30 | | | | | 100 |
| | 2 | 20 | 0,3 | 0,75 | 200 | 30 | 1 | | 2 | | 85 |
| | 3 | 10 | 0,3 | 0,50 | 200 | 30 | 1 | | 2 | | 70 |
| | 4 | 20 | 0,3 | 0,75 | 200 | 45 | 3 | 2 | 1 | 2 | 60 |
| Té- moins | 1 | 12 | 0,2 | | 0 | | 1 | 7 | 3 | 1 | 0 |
| | 2 | 18 | 0,3 | | 0 | | 3 | 12 | 2 | 1 | 0 |
| | 3 | 10 | 0,3 | | 200 | 45 | 3 | 6 | | 1 | 0 |
| | 4 | 10 | 0,3 | | 200 chauf- fée à 60°. | 45 | 10 | | | | 0 |

70 p. 100 seulement des cobayes survivent. La mortalité est plus forte si on augmente la dose de venin et si on porte à quarante-cinq minutes l'intervalle compris entre cette épreuve et le traitement, mais le nombre des animaux qui survivent est toujours plus grand parmi les cobayes traités par le mélange de sérum et d'hyaluronidase, que parmi les cobayes traités par le sérum seul.

Les animaux qui succombent présentent les mêmes symptômes que les témoins non traités. Ils meurent dans les mêmes délais (*).

L'hyaluronidase seule est dépourvue de propriétés protectrices. Chauffée pendant trente minutes à 60°, puis ajoutée au sérum, elle n'en augmente pas l'action curative. Elle est également sans effet si on l'injecte dans l'hypoderme à distance du sérum.

2° *Influence de l'hyaluronidase sur la vitesse du passage des anticorps antivenimeux dans le sang.* — Dans les conditions de notre expérience, 5 mm³ de sérum antivenimeux neutralisent 10 μ g de venin de Cobra (tableau II). Voici, par comparaison, les résultats du titrage des 10 échantillons de sérum obtenus en saignant les cobayes d'expérience trente minutes (échantillon I), soixante minutes (échantillon II), cent vingt minutes (échantillon III) et cent quatre-vingts minutes (échantillon IV) après

(*) L'analyse statistique confirme le caractère hautement significatif des différences de comportement des deux groupes.

TABLEAU II.

| Sérum antivenimeux injecté sous la peau des cobayes | | Q. de sérum de cheval (en mm ³) décélée dans 1cm ³ de sérum de cobaye. | | |
|---|-----|---|-----------------|----------------|
| à la do- se de : (en cm ³) | | prélevé après: | | |
| | | 1h. | 2h. | 3h. |
| | | (II α) | (III α) | (IV α) |
| SÉRUM <u>seul</u> | 1 | - | - | - |
| | 2 | - | - | - |
| | 3,5 | - | - | #1,4 |
| | | (II β) | (III β) | (IV β) |
| SÉRUM + <u>HYALU</u> | 1 | - | - | - |
| | 2 | - | - | 1,4 |
| | 3,5 | - | 1,4 | 2,5 |

N. B. : — indique des résultats négatifs, la sensibilité de la méthode étant limitée au dosage de 1,4 mm³ de sérum antivenimeux. Les échantillons de sérum de cobayes (I α et I β) prélevés après trente minutes ne contenant pas d'anticorps antivenimeux, nous n'avons pas indiqué les résultats des titrages correspondants.

l'injection sous-cutanée de 2 cm³ de sérum antivenimeux tel quel (échantillon I α , II α ...) ou mélangé à l'hyaluronidase (échantillon I β , II β ...). [tableau III].

Les échantillons I α , II α , III α ne neutralisent pas 10 μ g de venin de Cobra à la dose de 3,5 cm³. Au contraire, l'échantillon IV α neutralise partiellement cette quantité de venin et les échantillons III β et IV β la neutralisent complètement aux doses respectives de 3,5 cm³ et 2 cm³.

Si on se fonde sur les résultats du titrage préalable, on est amené à conclure que deux heures après l'injection de 2 cm³ de sérum antivenimeux mélangé à 200 μ g d'hyaluronidase, le sérum des cobayes contient par centimètre cube, 1,4 mm³ du sérum étranger ; une heure plus tard, il en contient moins de 5 mm³, mais plus de 2,5 mm³.

En l'absence d'hyaluronidase, le passage des anticorps dans le sang des cobayes est beaucoup plus lent. En effet, le sérum des animaux témoins ne contient pas d'antivenin avant la troisième heure. A ce moment, il en renferme moins de 1,4 mm³.

TABEAU III. — L'augmentation de la vitesse de diffusion de l'immunsérum antivenimeux sous l'influence de l'hyaluronidase est-elle suffisante pour produire un choc anaphylactique chez les cobayes sensibilisés activement?

| Doses déchainantes d'immunsérum anti-venimeux. | Nombre de cobayes éprouvés. | Voie d'introduction du sérum. | Résultats |
|--|-----------------------------|--|---|
| 0,01 | 1 | Veine | Pas de choc |
| 0,05 | 1 | " | Pas de choc |
| 0,10 | 2 | " | 2: choc léger |
| 0,20 | 2 | " | 1: choc léger |
| 0,30 | 2 | " | 1: choc mortel |
| 0,40 | 2 | " | 1: choc léger |
| 0,50 | 4 | " | 1: choc mortel |
| | | | 2: choc mortel |
| | | | 4: choc mortel |
| I | 4 | Sérum tel quel sous la peau. | 2 meurent en 18hrs. 2 survivent. (pas de troubles apparents.) |
| 2 | 3 | Sérum tel quel sous la peau. | 3 meurent en 18 heures. |
| I | 4 | Sérum + 200 μ g d'hyaluronidase. | 2 meurent en 5h.30 2 survivent (pas de troubles apparents.) |
| 2 | 3 | Sérum + 200 μ g d'hyaluronidase. sous la peau. | 2 meurent en 3 heures. 1 meurt en 18 heures. |

(+) Choc mortel en quelques minutes.

3° L'augmentation de la vitesse de diffusion de l'immunsérum antivenimeux, sous l'influence de l'enzyme, est-elle suffisante pour déclencher le choc anaphylactique chez les animaux rendus hypersensibles par des injections antérieures de sérum de cheval?

Pour répondre à cette question, nous étudions la fréquence des accidents anaphylactiques chez les cobayes sensibilisés dans les conditions définies au paragraphe 5 du précédent chapitre, puis éprouvés, les uns, par une injection intraveineuse de sérum antivenimeux, les autres, par une injection sous-cutanée du même sérum tel quel ou additionné d'hyaluronidase (tableau III).

L'injection de sérum thérapeutique seul, ou de sérum mélangé à l'hyaluronidase, sous la peau des cobayes activement sensibilisés aux protéines sériques du cheval, ne déchaîne pas le choc anaphylactique, tel qu'il a été décrit par Theobald Smith, mais elle provoque des troubles généraux dont l'intensité est en relation avec la quantité de sérum administrée. En effet, à la dose de 2 cm³, soit vingt fois le volume minimum déchainant par la voie veineuse, elle tue les cobayes en dix-huit heures environ. La dose de 1 cm³ n'est pas toujours léthale.

En dépit de sa propriété de hâter la résorption du sérum introduit sous la peau, l'hyaluronidase, dans les conditions de notre expérience, n'augmente pas la mortalité.

TABLEAU IV.

| Doses déchainantes d'immunsérum antivenimeux. (en cm ³) | Nombre de cobayes éprouvés | Mode d'introduction au sérum | Résultats |
|--|----------------------------|-------------------------------------|---|
| 0,25 | 3 | veine | 3: choc léger |
| 0,50 | 3 | veine | { 1: choc léger 2: choc mortel |
| I | 8 | sérum tel quel sous la peau. | 8: aucun trouble. |
| I,5 | 4 | " | 4: aucun trouble. |
| I | 8 | sérum + 200 μ g d'hyaluronidase | { 2: légers troubles moteurs 6: aucun trouble. |
| I,5 | 4 | sous la peau. | 4: légers troubles respiratoires. |

Quant aux cobayes sensibilisés passivement, ils supportent, sans présenter de troubles graves, une injection sous-cutanée de 1 cm³ et 1,5 cm³ d'immunsérum antivenimeux tel quel, ou d'immunsérum associé à l'hyaluronidase (tableau IV).

DISCUSSION. — Le dosage des anticorps dans le sérum des cobayes, auxquels on injecte l'immunsérum antivenimeux sous la peau, présente de grandes difficultés si l'on tente de caractériser ces anticorps par leurs propriétés spécifiques.

La méthode que nous employons permet de déceler, à la limite de sa sensibilité, une activité antivenimeuse correspondant à 1,4 mm³ de l'immunsérum étalon.

Si nous nous référons aux résultats des titrages rapportés plus haut, et si nous admettons que le volume du sang d'un cobaye de 350 g est de 30 cm³, dont 15 cm³ sont représentés par du sérum qui véhicule les anticorps antivenimeux, nous sommes amenés à conclure que, trois heures après l'injection sous-cutanée de 2 cm³ d'immunsérum tel quel, le sang des cobayes contient moins de 1 p. 100 de la quantité totale de l'antivenin administré. Dans les mêmes délais, le sang des animaux qui ont reçu une injection d'un mélange du même sérum et d'hyaluronidase en contient plus de 2 p. 100, mais moins de 4 p. 100. Les résultats de cette expérience sont groupés dans le tableau V.

TABLEAU V. — Passage des anticorps antivenimeux dans le sang des cobayes éprouvés par une injection sous-cutanée de sérum antivenimeux C.

| Intervalle entre l'in- jection d'im- munsérum et le prélève- ment de sang (en heures) | Pourcentage de l'immunsérum dans le sang | |
|---|---|--|
| | Après une in- jection de 2cm ³ d'im- munsérum tel quel | Après une in- jection de 2cm ³ d'im- munsérum + 200 μ g d'hyaluronidase. |
| I | 0 | 0 |
| 2 | 0 | I à 2 |
| 3 | I | 2 à 4 |

Par comparaison avec les résultats des mesures de l'activité antivenimeuse du sang des animaux témoins, le taux des anticorps dans le sang des cobayes traités par l'immunsérum et l'hyaluronidase est deux à quatre fois plus élevé. Ces chiffres sont voisins de ceux que nous rapportons dans les tableaux VI

TABLEAU VI. — **Passage des anticorps antidiphthériques dans le sang des lapins éprouvés par une injection sous-cutanée d'antitoxine antidiphthérique telle quelle ou d'antitoxine associée au facteur de diffusion.**

| intervalle entre l'injec- tion d'immu- sérum et le prélèvement de sang (en heures) | Pourcentage de l'antitoxine dans le sang | |
|---|---|---|
| | Après une in- jection d'im- munsérum tel quel. | Après une in- jection d'im- munsérum + un facteur testi- culaire de dif- fusion. |
| 1 | 0,3 | 0,8 |
| 2 | 1,6 | 3,45 |
| 6 | 5,4 | 10,2 |
| 24 | 32 | 42 |

D'après Mc Lean et M. Morgan.

et VII qui concernent la diffusion dans le sang du lapin et du chien des anticorps antidiphthériques d'une part (Mc Lean et M. Morgan [5]), et des protéines plasmatiques « marquées » par l'isotope radioactif I^{131} d'autre part (H. H. Banks, H. Seligman et J. Fine [23]).

TABLEAU VII. — **Passage du plasma homologue « marqué » dans le sang des chiens éprouvés par une injection sous-cutanée de ce plasma tel quel ou associé à l'hyaluronidase.**

| Intervalle entre l'in- jection de plasma et le prélèvement de sang. (en heures) | Pourcentage du plasma "marqué" dans le sang | |
|---|--|---|
| | Après une in- jection de plasma tel quel. | Après une in- jection de plasma + hya- luronidase. |
| 1 | 1,06 | 1,5 |
| 3 | 1,5 | 2,2 |
| 5 | 1,88 | 3,2 |

D'après Banks, Seligman et Fine.

L'accélération de la vitesse de résorption de l'immunsérum

antivenimeux est trop faible pour produire un choc anaphylactique chez les animaux sensibilisés aux protéines sériques de cheval par une injection antérieure de ces protéines, mais elle est assez importante pour augmenter l'efficacité de l'antivenin chez les cobayes intoxiqués. A cet égard, nos expériences sont concluantes [24].

Par ailleurs, il existe une certaine discordance entre les résultats des mesures de l'activité antitoxique du sérum antivenimeux par les méthodes usuelles de titrage *in vitro* et ceux que nous résumons plus haut. En effet, pour neutraliser, dans les conditions définies par Ipsen [20], la dose de 0,3 mg de venin de Cobra que nous injectons aux cobayes, 270 mm³ d'immunsérum spécifique seraient nécessaires; il suffit d'injecter par la voie sous-cutanée 750 mm³ seulement de cet immunsérum associé à l'hyaluronidase, quarante-cinq minutes après l'épreuve du venin de Cobra, pour guérir 60 p. 100 des animaux intoxiqués.

L'expérience nous enseigne, d'autre part, que le venin de Cobra possède sensiblement la même toxicité lorsqu'il est injecté par la voie sous-cutanée ou par la voie veineuse.

Partant de ces données, nous sommes conduits à admettre qu'une fraction importante de venin de Cobra se répand dans les tissus pendant les quarante-cinq minutes qui précèdent le traitement. Or, il faut attendre deux heures avant de pouvoir déceler quelques millimètres cubes d'immunsérum dans le sang circulant.

Par quel mécanisme ce faible volume d'anticorps neutralise-t-il le venin ?

1° Si l'on admet que le sérum antivenimeux est déversé peu à peu dans le sang, à un moment où la concentration du venin est élevée, on est autorisé à penser que des conditions comparables à celles du phénomène de Bordet-Danysz (ou « effet Danysz ») sont réalisées. La valence moyenne de l'anticorps injecté sous la peau des cobayes serait plus élevée que celle du même anticorps lorsqu'on l'ajoute *in vitro*, en une seule fois, à l'antigène homologue.

2° D'autre part, la dilution de l'immunsérum dans les humeurs et le sang est de nature à augmenter son activité antitoxique. V. Brazil [25], puis B. A. Houssay et J. Negrete [26] ont en effet démontré qu'à faible concentration les sérums antivenimeux neutralisent plus de venin qu'à forte concentration.

3° On est enfin autorisé à penser qu'à la suite du traitement par l'immunsérum l'équilibre de la réaction entre le venin de Cobra et les éléments sensibles, entre autres les cellules nerveuses, est modifié par la présence des anticorps spécifiques. Cependant, la mesure à intervalles réguliers de l'activité antivenimeuse du sang des animaux auxquels on injecte l'immun-

sérum antivenimeux par la voie sous-cutanée ne nous renseigne : ni sur la distribution des anticorps dans l'organisme, ni sur leur vitesse de passage dans les tissus où il se fixe électivement le venin, ni sur le rythme de leur renouvellement.

Cette brève discussion souligne les difficultés du problème dont nous entreprenons l'étude. Cependant, les résultats de cette première série d'expériences nous autorisent à retenir les faits que nous résumons ci-dessous :

RÉSUMÉ. — 1° L'hyaluronidase favorise la diffusion de l'immunsérum antivenimeux (anti-*Naja tripudians*) sous la peau des cobayes et elle accroît la vitesse de son passage dans le sang.

2° Lorsque l'immunsérum antivenimeux est administré à des cobayes, trente à quarante-cinq minutes après l'injection d'une dose de venin de Cobra, mortelle en quelques heures, la protection des animaux qui survivent est plus élevée parmi ceux qui ont été traités par le mélange de sérum et d'hyaluronidase que parmi ceux auxquels on a injecté le sérum tel quel.

3° Trois heures après l'injection sous-cutanée de l'immunsérum antivenimeux, le sang des animaux d'épreuve contient moins de 1 p. 100 de la quantité totale de l'antivenin injecté. Dans les mêmes délais, le sang des animaux traités par un mélange du même immunsérum et d'hyaluronidase en contient deux à quatre fois plus.

4° Dans les conditions de nos expériences, la fréquence des accidents anaphylactiques n'est pas plus grande parmi les cobayes traités par une injection sous-cutanée d'un mélange d'immunsérum antivenimeux et d'hyaluronidase que parmi les cobayes traités par l'immunsérum tel quel, lorsque ces rongeurs ont été sensibilisés par une injection de sérum de cheval.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. MEYER et J. W. PALMER. *J. biol. Chem.*, 1934, **107**, 629.
- [2] K. MEYER, J. DUBOS et E. M. SMYTH. *Proceed. Soc. exp. Biol. med.*, 1936, **34**, 816.
- [3] E. CHAIN et E. S. DUTHIE. *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 324.
- [4] F. DURAN-REYNALS. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 6 ; *J. exp. Med.*, 1929, **50**, 327.
- [5] D. MC LEAN et M. MORGAN. *J. Path. a. Bact.*, 1933, **36**, 193.
- [6] M. L. SOM, S. S. SCHEIERSON et M. L. SUSSMANN. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **70**, 96.
- [7] C. K. KIRBY, J. E. ERKENHOFF et J. P. LOOBY. *Ann. New York, Acad. Sci.*, 1950, **52**, 1167.
- [8] C. K. KIRBY, J. P. LOOBY et J. E. ERKENHOFF. *Surgery*, 1949, **25**, 101.

- [9] J. SCHWARTZMAN, A. T. HENDERSON et E. KING. *J. Pediat.*, 1948, **33**, 267.
- [10] J. SCHWARTZMAN. *J. Pédiat.*, 1949, **34**, 559.
- [11] F. DURAN REYNALS et E. GOLDSMITH. *Nature*, 1949, n° 4135, 184.
- [12] L. G. BURKET et P. GYORGY. *Pediatrics*, 1949, **3**, 56.
- [13] W. GAISFORD et D. EVANS. *Lancet*, 1949, **257**, 505.
- [14] A. T. HENDERSON, S. L. WALLACE et R. E. FANCETT. *U. S. Naval Med. Bull.*, 1948, **48**, 865.
- [15] O. HECHTER, S. K. DOPKEEN et M. H. YUDELL. *J. Pediat.*, 1947, **30**, 645.
- [16] H. TINT et R. BOGASH. *J. biol. Chem.*, 1950, **15**, 501.
- [17] E. H. KASS et C. V. SEASTONE. *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 319.
- [18] T. N. HARRIS et S. HARRIS. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 255.
- [19] O. HECHTER. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 77 ; *Ann. New York Acad. Sci.*, 1950, **52**, 1028.
- [20] J. IPSEN. *Bull. Org. Soc. des Nations*, 1938, **7**, 785.
- [21] C. DELEZENNE et S. LEDEBT. *C. R. Soc. Biol.*, 1911, **71**, 121.
- [22] P. BOQUET, M. DWORETZKY et H. S. ESSEX. *Am. J. Physiol.*, 1950, **161**, 561.
- [23] H. H. BANKS, H. SELIGMAN et J. FINE. *J. Clin. Invest.*, 1949, **28**, 548.
- [24] P. BOQUET, A. BUSSARD et Y. IZARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 482.
- [25] Vital BRAZIL. *Coll. Trabalhos Instituto Butantan*, 1907, 119.
- [26] B. A. HOUSSAY et J. NEGRETE. *Rev. Ass. Méd. Argentine*, 1921, **30**, 1.

LES RÉACTIVITÉS DES SOUCHES BACTÉRIENNES VIS-A-VIS DES PHAGES. MÉTHODES D'ÉVALUATION

par R. WAHL (*).

(*Institut Pasteur.*)

Les réactions d'une population bactérienne vis-à-vis d'un phage dépendent de nombreux facteurs : température, milieu, pH, oxygénation... et enfin d'un facteur propre à la souche dont elle provient et que nous avons proposé d'appeler *sa réactivité* [4].

Nous avons vu qu'on peut distinguer trois types réactionnels de souches : résistant, semi-résistant et sensible [5].

Mais nous avons constaté en même temps que toutes les bactéries d'une population issue d'une souche pure n'ont pas des réactions identiques vis-à-vis d'un phage pur. En premier lieu les populations semi-résistantes sont par nature hétérogènes du point de vue de leurs réactions vis-à-vis du phage ; de plus, dans toutes les populations sensibles ou semi-résistantes il apparaît, pendant la croissance, des bactéries dont les caractères réactionnels sont modifiés, qu'il s'agisse de réceptivité acquise par un mécanisme inconnu (dans les populations semi-résistantes) ou de mutation vraie (dans les deux types de populations).

Rappelons enfin qu'à la suite de l'introduction de phages en excès dans une population semi-résistante ou sensible il se produit dans un premier temps une lyse primaire, laissant survivre un certain nombre de bactéries, et, si les bactéries survivantes sont semi-résistantes, des réactions secondaires, lytiques et bactériostatiques dans leur descendance.

La *réactivité totale* d'une souche est donc la somme de sa *réactivité actuelle*, qui est à l'origine de la lyse primaire, et de sa *réactivité potentielle*, d'où découlent ses réactions secondaires.

Par définition, nous considérons la réactivité actuelle comme numériquement égale au taux des bactéries réceptives de la souche. Quant à la réactivité potentielle elle doit être proportionnelle à la fois au taux des bactéries réceptives apparues après la lyse primaire, taux compté par rapport à l'ensemble de la

(*) *Société française de Microbiologie*, séance du 3 juillet 1952.

descendance des bactéries survivantes (quand celles-ci se multiplient en présence de phages) et au taux des bactéries réfractaires de la souche. Nous la définissons comme égale au produit de ces deux nombres.

Nous avons vu que les types réactionnels ne pouvaient être définis que par rapport à un phage déterminé [5]. Il en est évidemment de même des réactivités. Celles-ci ne peuvent donc servir à comparer le comportement de plusieurs souches vis-à-vis de plusieurs phages mais bien de plusieurs souches vis-à-vis du même phage, ou d'une même souche vis-à-vis de plusieurs phages.

Nous nous proposons dans le présent travail de décrire diverses méthodes permettant d'évaluer les réactivités actuelle et potentielle, et d'en fixer les indications respectives.

Certaines de ces méthodes conviennent seulement pour la réactivité actuelle, d'autres conviennent également pour celle-ci et pour la réactivité potentielle. Cependant, pour faciliter l'exposé, nous décrirons séparément les méthodes d'évaluation de chacune des deux réactivités partielles.

I. — METHODES D'EVALUATION DE LA REACTIVITE ACTUELLE

La réactivité actuelle étant égale à la proportion de bactéries réceptives de la souche, il faut évaluer cette proportion pour des populations représentatives de celle-ci et en déduire sa valeur pour l'ensemble de la souche. Pour cela, il faut, après avoir choisi correctement les populations, y évaluer, d'une part le nombre des bactéries viables, d'autre part celui des bactéries réceptives. Celui-ci peut être soit déterminé directement, soit calculé par différence à partir du nombre des bactéries réfractaires.

1° CHOIX DES POPULATIONS REPRÉSENTATIVES DE LA SOUCHE. — Les populations doivent être choisies de façon à répondre aux exigences de la méthode adoptée : numération des bactéries réfractaires ou numération des bactéries réceptives.

Par exemple, nous verrons que l'on a recours à la numération des bactéries réfractaires, dans les cas où celles-ci sont peu nombreuses. La concentration des populations choisies doit donc être assez élevée dans cette éventualité. Mais, comme nous le verrons, il faut, avant la numération, lyser les bactéries réceptives par un excès de phages ; on est donc limité dans les concentrations des populations par le titre maximum des préparations de phages (10^9 à 10^{10} par centimètre cube). Si les populations les plus nombreuses possibles ne contiennent que peu de bactéries réfrac-

taires, il faut répéter l'évaluation sur plusieurs échantillons de la souche, contenant le même nombre de bactéries dans le même volume et faire une étude statistique. Le nombre d'échantillons utilisés sera d'autant plus grand que le pourcentage est plus faible.

Si l'on fait, au contraire, une numération des bactéries réceptives, le choix des populations est basé sur d'autres considérations, comme nous allons le voir.

2° NUMÉRATION DES BACTÉRIES VIABLES DE LA POPULATION. — Elle se fera par la méthode habituelle de numération des colonies.

3° MÉTHODES DE NUMÉRATION DES BACTÉRIES RÉCEPTIVES. — On peut utiliser pour cette numération une méthode directe ou une méthode indirecte.

a) *Méthode directe.* — Elle est basée sur la *numération directe des bactéries infectées*, à la suite de l'introduction d'un *excès de phages* dans la population (en milieu liquide).

L'excès de phages introduit doit être suffisant pour infecter en un temps toutes les bactéries réceptives. Le mélange est placé dans un agitateur au bain-marie à 37° pendant le temps juste suffisant pour l'adsorption des phages sur les bactéries ; puis il est transporté dans la glace fondante. Les phages restés libres sont ensuite inactivés par du sérum antiphage, puis un volume déterminé d'une dilution convenable du mélange est étalé sur une plaque de gélose avec une suspension de bactéries sensibles au phage. Le nombre des plages est, en principe, égal à celui des bactéries infectées. Nous prions le lecteur de se reporter, pour plus de détails, aux publications déjà citées [4].

b) *Méthode indirecte.* — Cette méthode consiste à introduire un petit nombre de phages dans la population, de sorte qu'on ait au contraire *un excès de bactéries* et à évaluer le *pourcentage des phages infectants*. On peut le considérer comme sensiblement égal au pourcentage des bactéries réceptives. Cette infection peut être faite en milieu liquide, à condition de centrifuger à froid les bactéries aussitôt après l'adsorption des phages et de compter dans le surnageant les phages non adsorbés [4]. Mais il est beaucoup plus simple d'utiliser un milieu gélosé et de comparer le nombre de plages produites par la même préparation de phages convenablement diluée, d'une part, sur la souche examinée et, de l'autre, sur une souche sensible étalon. La réactivité actuelle est exprimée par le rapport de ces deux nombres.

Cette méthode comporte *des causes d'erreurs*. En effet, pour qu'un phage produise une plage, il faut : a) qu'il soit adsorbé sur une bactérie réceptive ; b) que les phages produits par celle-ci rencontrent d'autres bactéries réceptives et ainsi de suite. Or, d'une part, certaines

bactéries réceptives peuvent ne pas rencontrer de phages, ceux-ci étant très dispersés sur la gélose, et, d'autre part, les bactéries réceptives ne sont entourées que de bactéries réfractaires. Cependant, les bactéries réceptives infectées sont habituellement le point de départ d'une plage, parce qu'il se produit, de proche en proche, un passage à l'état réceptif chez un nombre suffisant de bactéries réfractaires. C'est pourquoi, malgré ces objections, cette méthode, en pratique, donne des résultats satisfaisants. Il est possible néanmoins que, pour certaines souches, le passage à l'état réceptif des bactéries réfractaires ne se fasse pas. La méthode serait alors en défaut, et il faudrait recourir à l'infection des bactéries en milieu liquide.

Rappelons que la comparaison entre les plages produites sur la souche examinée et sur une souche étalon a déjà été indiquée pour la détermination du type réactionnel de la souche [5].

4° MÉTHODES DE NUMÉRATION DES BACTÉRIES RÉFRACTAIRES (pour le calcul par différence du nombre des bactéries réceptives). — L'évaluation du nombre des bactéries survivant à la lyse primaire par un excès de phages dans des populations représentatives de la souche se fait par une des trois méthodes suivantes :

- 1° Numération après la lyse sur milieu gélosé ;
- 2° Numération après la lyse en milieu liquide ;
- 3° Lyses en série de populations bactériennes de différentes concentrations.

1° *Méthode de numération des bactéries survivant à la lyse sur milieu gélosé.*

La population étudiée est étalée sur gélose avec un excès de phages. Le nombre des colonies est considéré comme égal au nombre de bactéries survivantes. Nous verrons que cette méthode n'est pas recommandable.

2° *Méthode de numération des bactéries survivant à la lyse en milieu liquide.*

On introduit un excès de phages dans la population choisie après y avoir dénombré les bactéries. Après la lyse, on fait une numération des bactéries survivantes par la méthode des colonies sur gélose en présence de sérum antiphage. Dans ces conditions, toutes les bactéries survivantes, même celles dont la descendance est réceptive, donnent une colonie, puisque les phages libres sont détruits.

3° *Méthode des lyses en série.*

Cette méthode n'est utilisable que s'il existe une certaine concentration limite de bactéries au-dessous de laquelle les populations sont intégralement lysées par un excès de phages.

Dans ce cas, on soumet à l'action d'un excès de phages diverses populations de bactéries convenablement choisies. Les

moins nombreuses seront lysées totalement, les autres donneront naissance à une culture, plus ou moins tardive et plus ou moins pauvre. On détermine ainsi la plus grande population totalement lysable. On en déduit la proportion de bactéries réfractaires de la souche, car seules les populations totalement lysables n'en contiennent pas.

Pratiquement, nous opérons de la façon suivante :

On fait, à partir d'une culture sur milieu gélosé ayant dix-huit heures d'étuve, une suspension bactérienne épaisse dans un milieu de culture approprié. On pratique, en opérant sur une dilution convenable, une numération approchée des bactéries de cette suspension par une méthode opacimétrique : une échelle d'opacité est établie avec des suspensions formolées du même germe dans le même milieu en tubes scellés et les comparaisons se font à l'œil nu ou à l'électrophotomètre. Cette évaluation approchée permet de choisir les dilutions à utiliser pour l'épreuve. Mais pour le calcul de la réactivité on utilisera une numération des bactéries viables par la méthode des colonies sur gélose, dont le résultat sera connu le lendemain.

Notons que pour l'épreuve il faut utiliser une préparation du phage à étudier ayant un titre élevé et faite, autant que possible, dans le même milieu (1).

On dispose sur un portoir 15 tubes à essai stériles, tous de même diamètre, en verre de même épaisseur et de même qualité.

Quatorze de ces tubes sont disposés par paires. Les deux tubes de chaque paire reçoivent chacun 9 cm^3 de la même dilution de la suspension mère. On fait donc en tout 7 dilutions différentes, de façon que les deux tubes de chaque paire contiennent respectivement des quantités de bactéries s'étageant de 2×10^3 à 2×10^8 bactéries suivant une progression géométrique de raison 10. Un des tubes de chaque paire reçoit en outre 1 cm^3 de la préparation de phage et l'autre 1 cm^3 de milieu non ensemencé (celui-ci est un témoin d'opacité).

Le nombre de phages est le même dans tous les tubes : il égale cinq à dix fois le nombre des bactéries de la population la plus nombreuse (environ 10^9 phages). Les quantités en bactéries sont choisies en considération des taux de mutation observés qui n'ont jamais dépassé 10^{-8} et la raison de la progression, en tenant compte des probabilités de répartition des mutants.

Le quinzième tube reçoit 9 cm^3 de milieu non ensemencé et 1 cm^3 de la préparation de phage, et sert de témoin pour la stérilité de celui-ci.

Le portoir est placé au début de la matinée dans une étuve à 37° . Les tubes sont examinés plusieurs fois dans la première journée et deux fois chacun des jours suivants. Chaque fois on y évalue par opacimétrie le nombre de bactéries. Cette évaluation n'est possible que si ce nombre est assez élevé pour opacifier le milieu, c'est-à-dire

(1) On verra dans une prochaine publication que nous avons étudié par cette méthode l'action de phages concentrés et partiellement purifiés. Ces conditions idéales de milieu ne sont pas alors remplies.

200 000 000 (20 000 000 par centimètre cube). Dans certains cas, le milieu ne s'opacifie qu'au bout de plusieurs jours.

Au bout de dix-huit heures on fera des ensemencements sur gélose et en milieu liquide à partir des tubes restés clairs, car si à ce moment la stérilisation n'est pas totale, elle ne se fera pas et on verra apparaître tôt ou tard (parfois seulement après huit jours d'étuve) une culture secondaire. On peut compléter cette épreuve par un ensemencement sur gélose avec du sérum antiphage à partir des tubes restés clairs.

La stérilisation n'est possible qu'en l'absence de mutants résistants ou semi-résistants. Si donc le dernier tube stérile contient 2×10^n bactéries, nous dirons que la proportion de bactéries réfractaires de la souche (c'est-à-dire le taux de mutation en bactéries réfractaires) est comprise entre $0,5 \times 10^{-n}$ et $0,5 \times 10^{-(n+1)}$.

Dans beaucoup de cas cette précision suffit, mais on peut l'augmenter en faisant une étude statistique de la répartition des bactéries réfractaires dans une série de populations semblables. On prépare par exemple 20 tubes reproduisant identiquement le dernier tube resté stérile dans la première expérience. En général, ces 20 tubes ne restent pas tous stériles, et la proportion de tubes stériles dans la série permet de calculer la probabilité pour qu'un mutant au moins se trouve parmi 2×10^n bactéries de la souche. Cette probabilité suit une loi de Poisson. La répartition statistique explique que, dans quelques cas exceptionnels, le dernier tube fertile soit précédé d'un tube stérile.

La méthode des lyses en série est la plus fidèle de toutes car : a) en milieu liquide, on peut escompter avec plus de sécurité qu'en milieu solide une atteinte régulière de toutes les bactéries réceptives ; b) elle permet d'augmenter la précision par une étude statistique. De plus, elle donne, comme nous allons le voir, des renseignements importants sur la réactivité potentielle. Mais elle ne convient pas à tous les cas, comme nous le verrons plus loin.

II. — METHODES POUR EVALUER LA REACTIVITE POTENTIELLE

Seules les souches chez lesquelles on trouve des bactéries réceptives dans la descendance des bactéries réfractaires (souches semi-résistantes et souches sensibles productrices de mutants semi-résistants) ont une réactivité potentielle non nulle.

L'évaluation de la réactivité potentielle est donc toujours basée sur l'étude des réactions aux phages de cultures semi-résistantes : réactions qui consistent en lyses partielles échelonnées, associées, dans un nombre de cas non encore précisé, avec des phases de bactériostase. Mais ces réactions complexes, en plusieurs temps, s'opposent à toute évaluation quantitative précise. En effet, d'après la définition de la réactivité potentielle, il faudrait pouvoir évaluer, d'une part, le nombre de descendants qu'auraient eus les bactéries réfractaires dans une culture sans phage, d'autre

part, le nombre de bactéries qui ont été lysées dans cette descendance. Et encore, ce second nombre ne donne qu'une idée imparfaite des pertes que subit la culture du fait des lyses successives, car les lyses qui se produisent au début de la culture ont une répercussion plus grande que celles qui se produisent à la fin. Il faut donc se contenter pour la réactivité potentielle d'apprécier un ordre de grandeur, en se basant soit sur l'allure de la courbe de croissance de la culture (méthode directe), soit sur les particularités de la multiplication du phage [méthode indirecte] (2).

1° ETUDE DE LA CROISSANCE DE LA CULTURE (méthode directe).

— Cette méthode convient pour les souches à réactivité actuelle forte : la lyse primaire d'une population provenant d'une telle souche intéresse presque toutes les bactéries ; la réactivité potentielle ne concerne que la descendance d'un petit nombre de mutants ; autrement dit, elle conditionne la croissance de la culture secondaire.

L'allure de celle-ci dépend de l'origine de la population considérée et du nombre de bactéries qu'elle contient. Si l'on compare entre elles des populations à forte réactivité actuelle issues de différentes souches sensibles et contenant le même nombre de bactéries, on constate qu'elles donnent des cultures secondaires différant par leur délai d'apparition, la durée de leur croissance, la longueur des arrêts de cette croissance et le degré d'opacité finalement atteint. Il est évident que ces différences sont fonction de l'intensité des réactions des cultures secondaires à l'action lytique et bactériostatique du phage, et par conséquent de la réactivité potentielle de la souche dont elles sont issues. Par exemple, de deux cultures secondaires apparaissant dans le même délai et ayant au début la même opacité, celle dont l'opacité n'augmente pas dans la suite a une réactivité potentielle plus forte que celle qui présente une reprise de multiplication plus ou moins tardive.

D'un autre côté, des populations, issues d'une même souche sensible et contenant des nombres différents de bactéries, diffèrent également par l'intensité des réactions que nous venons d'indiquer, en ce sens que l'apparition de la culture secondaire est d'autant plus tardive, la durée de sa croissance d'autant plus courte et l'opacité finalement atteinte d'autant plus faible, que la population est moins nombreuse. Or, les populations contiennent évidemment d'autant moins de bactéries semi-résistantes qu'elles sont moins nombreuses. Les réactions des cultures secondaires

(2) On peut également obtenir une indication intéressante en faisant lyser par un excès de phages une population représentative de la souche, et en comparant le nombre de colonies que le lysat produit sur gélose avec et sans sérum antiphage [voir 3].

vis-à-vis du phage varient donc également en fonction du nombre des mutants semi-résistants de la population.

Au total, la réactivité potentielle est d'autant plus forte que les réactions indiquées (retard d'apparition de la culture secondaire, etc.) seront plus marquées pour une population bactérienne plus nombreuse.

2° ETUDE DE LA MULTIPLICATION DES PHAGES (méthode indirecte). — Cette méthode est basée sur l'évaluation du nombre des phages produits après l'achèvement de la première phase de multiplication des phages, celle qui résulte de la lyse primaire. En divisant ce nombre par le nombre moyen (obtenu par la méthode du « burst size ») de phages produits par une bactérie infectée, on aurait une évaluation du nombre absolu des bactéries atteintes par la lyse secondaire.

En ajoutant au nombre de bactéries lysées, ainsi obtenu, celui de bactéries présentes à la fin de la croissance, on obtiendra une évaluation du nombre de bactéries produites pendant la croissance. Il sera ensuite possible de calculer le pourcentage de bactéries lysées au cours de cette croissance.

III. — INDICATIONS DES DIVERSES METHODES

L'évaluation de la réactivité se présente dans des conditions différentes, suivant qu'il s'agit de souches contenant une proportion de bactéries réceptives forte ou faible.

Le choix d'une méthode d'évaluation de la réactivité doit donc être précédé d'une rapide estimation de la proportion des bactéries réceptives de la souche, établie d'après l'importance de la lyse en un temps, par un excès de phages, d'une suspension contenant environ 5×10^8 bactéries par centimètre cube. La lyse est évidemment d'autant plus complète que la proportion des bactéries réceptives est plus grande.

1° CAS DES SOUCHES CONTENANT UNE TRÈS FORTE PROPORTION DE BACTÉRIES RÉCEPTIVES. — C'est celui des souches sensibles et peut-être de quelques souches semi-résistantes.

Evaluation de la réactivité actuelle. — On ne peut pas utiliser pour ces souches la numération des bactéries réceptives. En effet, la différence entre le nombre des bactéries réceptives et le nombre total des bactéries est de l'ordre de grandeur des erreurs des méthodes de numérations (qu'il s'agisse de méthodes directes ou indirectes). Au contraire, après la lyse massive en un temps de toutes les bactéries réceptives, on peut faire une numération

exacte des bactéries survivantes qui sont les bactéries réfractaires. Nous avons vu qu'elle peut se faire par trois méthodes différentes, qui sont toutes les trois des méthodes directes. Nous allons en étudier les avantages et les inconvénients respectifs.

1° *La numération des bactéries survivant à la lyse sur milieu gélosé* n'est pas recommandable, pour les raisons suivantes :

a) Le nombre de colonies secondaires ne correspond pas exactement à celui des bactéries réfractaires. En effet, on doit choisir entre deux procédés qui tous deux comportent des causes d'erreur sérieuses :

1° L'un des procédés consiste à étaler le phage sur une suspension de bactéries assez dense, pour que toutes les bactéries réceptives soient atteintes par des phages, les unes d'emblée, les autres de proche en proche, par lyses successives. Or, dans ce cas, la souche n'est pas lysée en un temps et par conséquent on ne compte pas uniquement le nombre initial de bactéries réfractaires de la population ; de plus, si les bactéries réfractaires sont très nombreuses, les colonies peuvent correspondre chacune à plus d'une bactérie.

2° L'autre procédé consiste à étaler une population bactérienne assez peu nombreuse pour éviter ces écueils, mais alors, même avec les préparations les plus concentrées possibles, les phages seront trop éloignés les uns des autres pour que toutes les bactéries aient des chances suffisantes d'en rencontrer.

De plus, dans le cas des souches semi-résistantes, les deux procédés comportent une cause d'erreur commune due à ce que certaines bactéries réfractaires ne donnent pas de colonies, parce que leur descendance est réceptive.

b) Cette méthode ne donne aucune indication sur la réactivité potentielle, car les colonies peuvent être aussi bien composées de bactéries semi-résistantes que de bactéries résistantes et les premières peuvent contenir des bactéries réceptives dont la lyse est masquée par la multiplication des autres bactéries.

2° *La numération des bactéries survivant à la lyse en milieu liquide* n'est pas entachée des mêmes causes d'erreur. En effet :

a) La probabilité de rencontre des bactéries avec les phages est pratiquement égale à l'unité, et toutes les bactéries réceptives sont tuées avant l'étalement sur gélose.

b) On peut faire la numération en présence de sérum antiphage de sorte que les descendants réceptifs des bactéries semi-résistantes réfractaires ne soient pas lysés. Mais l'emploi de cette technique est restreint par la nécessité de posséder un sérum inactivant spécifique pour le phage utilisé.

c) Enfin, bien que cette méthode donne sur la réactivité potentielle quelques indications tirées de l'examen de la culture secondaire, ces indications sont beaucoup plus restreintes que celles

de la méthode suivante, en particulier au point de vue des retards de croissance et des lyses secondaires.

3° *La méthode des lyses en série* est presque toujours celle des trois qu'il faut préférer ; complétée, d'une part, par la vérification de la stérilité par des subcultures et, d'autre part, par l'étude statistique de la stérilisation, elle mesure de façon satisfaisante la réactivité actuelle des souches contenant une forte proportion de bactéries réceptives.

Pour la mesure de la réactivité potentielle de ces mêmes souches, cette dernière méthode est également la meilleure : on étudie celle-ci, comme nous l'avons vu, par l'observation prolongée des cultures secondaires dans les différents tubes de la série.

2° CAS DES SOUCHES CONTENANT UNE FAIBLE PROPORTION DE BACTÉRIES RÉCEPTIVES, c'est-à-dire de la plupart des souches semi-résistantes. *La réactivité actuelle* de ces souches doit être évaluée par une méthode qui utilise la *numération des bactéries réceptives*, car la situation est inverse de celle des souches à très grande prédominance de bactéries réceptives. En particulier, on ne peut pas saisir le moment de la lyse primaire, qui porte sur trop peu de bactéries.

Nous avons vu que cette numération peut être faite soit par la méthode directe de numération de bactéries infectées, soit par la méthode indirecte de numération des phages adsorbés. La première est plus précise, mais elle est plus compliquée et nécessite l'emploi du sérum antiphage dont la préparation est longue. La seconde suffit le plus souvent.

Sur la *réactivité potentielle* la courbe de croissance ne donne pas de renseignements, car la lyse primaire et chacune des lyses secondaires portent sur de petits nombres de bactéries, de sorte que la croissance de la culture paraît normale du début jusqu'à la fin. Il faut donc utiliser la méthode indirecte (évaluation de la multiplication des phages). A vrai dire, cette évaluation ne peut être que globale, car on ne peut discriminer ce qui revient à la lyse primaire et aux lyses secondaires. Mais si chaque poussée lytique secondaire porte sur un petit nombre de bactéries, l'ensemble des lyses secondaires atteint au total un nombre de bactéries beaucoup plus grand que l'unique lyse primaire. On peut donc considérer l'effet de celle-ci comme négligeable, ce qui permet de prendre la production totale de phages comme valeur approchée de la production de phages correspondant aux seules lyses secondaires. On en déduira, en calculant comme nous l'avons indiqué plus haut, le nombre de bactéries lysées, puis le pourcentage de bactéries lysées pendant la croissance.

DISCUSSION.

Il nous paraît utile d'essayer de montrer pourquoi la notion de réactivité des souches nous paraît mieux s'accorder avec les faits que celle de « virulence » des phages de d'Hérelle [1] et, à sa suite, de plusieurs auteurs (1). Ces auteurs avaient remarqué que l'intensité de la lyse et le nombre de plages produits sur une même souche différaient beaucoup suivant les phages utilisés, ce qui correspondait pour eux à des différences de « virulence » (d'Hérelle), de « force » (Gratia) entre ces phages.

Pour d'Hérelle [1] la virulence d'un phage pour une souche était proportionnelle à l'intensité de sa multiplication sur elle.

Il faut d'abord préciser le niveau auquel cette multiplication est envisagée : bactérie ou population. Pour d'Hérelle et ses collaborateurs c'est le second et Sertic et Bulgakow [2] ont décrit, dans le but de mesurer la « virulence » d'un phage, une intéressante méthode pour suivre la multiplication dans une population de bactéries. Rappelons d'ailleurs que nos expériences ont montré que pour deux souches très voisines, mais dans les cultures desquelles le même phage, dans les mêmes conditions, se multiplie très différemment, le nombre moyen de phages produits par une bactérie infectée était sensiblement le même [4].

La « virulence » d'une préparation de phages pour une souche serait donc proportionnelle à son taux de phages actifs pour les bactéries de cette souche.

Il faudrait donc (et c'est ce que d'Hérelle admettait) que la virulence des phages d'un même lysat fût un caractère variable avec les individus et que, par contre, toutes les bactéries d'une souche eussent la même aptitude à multiplier les phages « virulents ». Or, nous n'avons jamais observé que le contraire. Une confusion pourrait cependant s'établir dans les cas de mutations de phages qui créent, en effet, un changement d'activité chez les mutants. Mais le taux de celle-ci est beaucoup trop faible (de l'ordre de 10^7 ou 10^8) pour exercer une influence repérable sur l'intensité de la lyse et sur le nombre des phages. Il est vrai qu'on peut obtenir de fortes multiplications de phages mutants sur une souche résistante aux phages dont ils dérivent, mais il ne s'agit pas d'une adaptation ou d'une augmentation de virulence du phage originel, lequel au contraire disparaît.

La notion de réactivité des souches nous paraît donc mieux correspondre aux faits observés par nous que celle de virulence des phages.

Il reste à examiner certaines causes d'erreur dans l'évaluation

(1) Récemment Lwoff et ses collaborateurs ont attribué un sens différent à l'expression « virulence d'un phage ».

de la réactivité d'une souche. Celle-ci est égale au pourcentage des bactéries lysables par les phages correspondants. Mais les préparations de phages contiennent parfois d'autres facteurs pouvant agir soit dans le même sens qu'eux, soit en sens inverse. Les premiers sont d'une part le facteur bactériostatique de R. Wahl et J. Josse-Goichot [6], d'autre part les mutants de phages actifs sur les mutants bactériens résistants au phage originel; les seconds sont des facteurs antagonistes du phage encore très mal connus. L'action du phage est généralement assez prépondérante pour que ces causes d'erreur soient négligeables. Mais il n'en est pas toujours ainsi et nous y reviendrons dans une prochaine publication.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° La réactivité d'une souche vis-à-vis d'un phage est une propriété qui lui est propre. Elle est proportionnelle au taux de ses bactéries réceptives à ce phage. Il faut distinguer une réactivité actuelle et une réactivité potentielle, celle-ci étant égale aux taux des bactéries réceptives nouvelles qui apparaissent pendant la croissance en présence de phages.

2° Diverses méthodes d'évaluation de la réactivité actuelle sont décrites dans le présent travail. Elles sont basées sur la numération dans des populations représentatives de la souche soit des bactéries réceptives, soit des bactéries réfractaires.

La numération des bactéries réceptives peut se faire par une méthode directe ou par une méthode indirecte (calcul du pourcentage de phages infectants).

La numération des bactéries réfractaires peut se faire de trois façons : après une lyse sur milieu gélosé, après une lyse sur milieu liquide, à l'aide de lyses en série. La méthode des lyses en série qui est particulièrement décrite est la plus importante.

3° L'évaluation de la réactivité potentielle peut être faite également par une méthode directe (étude de la croissance de la culture) ou par une méthode indirecte (étude de la multiplication des phages).

4° Les indications des différentes méthodes dépendent de la proportion des bactéries réceptives de la souche. Si elle est forte, la méthode des lyses en série est la meilleure; si elle est faible, il faut préférer, pour la réactivité actuelle la numération des bactéries réceptives et, pour la réactivité potentielle l'évaluation de la multiplication des phages.

5° La notion de réactivité est discutée et les arguments qui peuvent justifier sa substitution à celle de « virulence » des phages sont présentés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. D'HÉRELLE. *Le bactériophage et son comportement*, Paris, 1926, Masson, édit.
- [2] V. SERTIC et N. BULGAKOW. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 561.
- [3] R. WAHL et TERRADE. *Ces Annales*, 1950, **79**, 255.
- [4] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 28, 44, 194 et 266.
- [5] R. WAHL. *Ces Annales*, 1952, **83**, 464.
- [6] R. WAHL et J. JOSSE-GOICHOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1225 et 1703.

LES ANÉMIES HÉMOLYTIQUES EXPÉRIMENTALES CHEZ LES OVIDÉS

par A. EYQUEM, P. MILLOT et J. ROBIN (*).

(Institut Pasteur. [Service de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE].)

On ne connaît pas encore chez les ovidés d'observation indiscutable d'anémie hémolytique attribuable à l'iso-immunisation maternelle. Quant aux anémies hémolytiques expérimentales, elles n'ont été réalisées chez les ovidés à l'aide d'hétéro-immunsérums qu'exceptionnellement. (G. Pigoury communication personnelle.)

Nous avons signalé antérieurement que pour établir des différences sérologiques entre les chèvres et les moutons, nous avons préparé des hétéro-immunsérums de chèvre anti-mouton et de mouton anti-chèvre. Il était logique d'étudier, en conséquence, le pouvoir pathogène de ces anticorps en les inoculant à de jeunes chevreaux ou de jeunes agneaux.

1° ANÉMIE HÉMOLYTIQUE CHEZ L'AGNEAU. — Un agneau mâle pesant 20 kg environ, âgé de 2 mois, appartenant probablement à la race dite de l'Île de France, reçoit par voie sous-cutanée un mélange de sérums provenant de plusieurs chèvres immunisées vis-à-vis de globules de mouton :

A 11 h. 30, le 17 juillet 1951, 72 ml de ce mélange de sérums ayant un titre de 1/8 en eau physiologique et 1/64 en cryptagglutinoïdes.

A 16 h. 45, le 17 juillet 1951, 50 ml du mélange titrant 1/8 en eau physiologique.

Le 19 juillet 1951, il reçoit à 12 h. 30, 57 ml d'un sérum titrant 1/8 en eau physiologique et 1/64 en cryptagglutinoïdes, puis 55 ml d'un sérum titrant 1/8 en eau physiologique et 1/8 en cryptagglutinoïdes ;

Dans les heures qui suivent la première injection, l'animal présente un abattement prononcé avec une anémie des muqueuses qui s'accroît et s'accompagne d'adynamie complète avec polypnée.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 juillet.

L'examen hématologique montre une anémie progressive atteignant 3 800 000 globules rouges le 20 juillet 1951, au lieu de 10 400 000 globules rouges avant l'injection. Cette anémie persiste pendant une dizaine de jours pour ne disparaître que lentement. En même temps, on voit apparaître une leucopénie

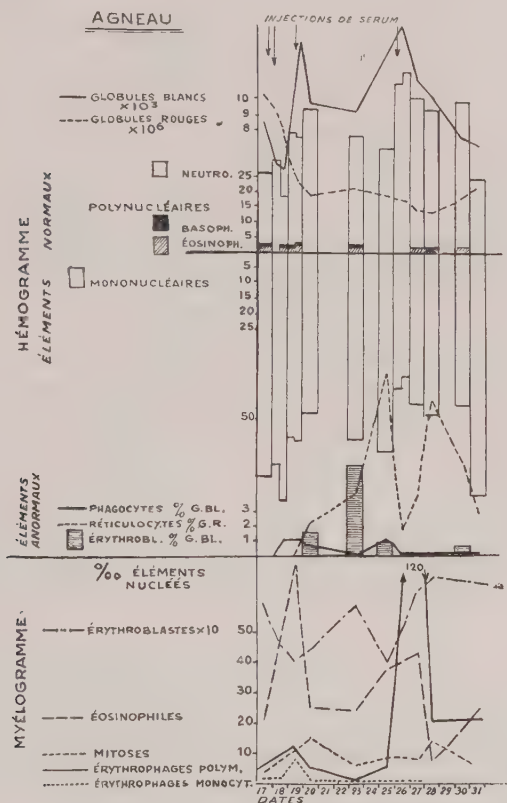


FIG. 1.

suivie d'une leucocytose biphasique coïncidant avec une érythroblastose discrète et une réticulocytose.

Le myélogramme présente au même moment une augmentation du nombre des érythrophages polymorphes et monocytaires, en même temps qu'une éosinophilie importante. L'anisocytose est particulièrement importante, atteignant son maximum au septième jour ; elle coïncide avec l'apparition de la poïkilocytose.

Après guérison de l'anémie, l'animal présente un arrêt de la croissance ; celle-ci reprend ensuite, mais lentement.

On peut donc conclure de cette expérience que le sérum de chèvre anti-globules rouges de mouton possède des propriétés hémolytiques pour le jeune agneau.

2° ANÉMIE HÉMOLYTIQUE CHEZ LE CHEVREAU. — Trois chevreaux nés le 5 juin 1951 reçoivent des hétéro-immunsérums de brebis immunisées à l'aide de sang de trois chèvres parmi lesquelles se trouvait la mère de ces jeunes chevreaux.

Le chevreau n° 1, mâle pesant 2,600 kg et âgé de 9 jours, reçoit par voie intraveineuse, 40 ml d'un sérum de mouton anti-chèvre présentant un titre agglutinant de 1/32 vis-à-vis de globules rouges en suspension saline, et 1/128 sous forme d'agglutinine incomplète. Dès la fin de l'injection effectuée en vingt minutes l'animal présente une respiration haletante avec signe de choc puis agitation et crises convulsives. Il meurt une heure après la fin de l'injection ; ses muqueuses sont très anémiées mais on n'observe pas d'hémoglobinurie.

Le chevreau n° 2, du sexe femelle, pesant 5,300 kg, âgé de 29 jours, reçoit 375 ml d'un sérum de mouton anti-chèvre présentant un titre agglutinant de 1/20 vis-à-vis de ses globules rouges. Une heure après le début de l'injection, l'animal présente de l'adynamie avec polypnée ; les muqueuses sont anémiées ; une hémoglobinurie se manifeste quatre heures après l'injection.

L'animal est sacrifié huit heures après le début de l'injection.

L'examen histologique permet de mettre en évidence une congestion vasculaire intense, avec lyse des globules rouges, agglutination de stroma dans les vaisseaux et érythrophagocytose intense dans la rate.

Le chevreau n° 3, d'un poids de 2,500 kg, âgé de dix jours, reçoit le 15 juin 1951, à 18 heures, par voie sous-cutanée, 37 ml d'un mélange de sérums de mouton anti-chèvre dont le titre agglutinant vis-à-vis de ses globules rouges est de 1/64, et dix-huit heures après 58 ml du même sérum. Cette injection entraîne chez l'animal une anémie avec baisse du taux de globules rouges de 8 760 000 à 4 460 000.

Cette anémie atteint son maximum le cinquième jour ; elle s'accompagne d'érythroblastose et d'érythrophagocytose. La régénération est précédée d'une réticulocytose et d'une hyperplasie médullaire avec augmentation du taux des pro-érythroblastes et des pro-myélocytes. L'anémie est entièrement réparée le quinième jour après l'expérience.

Ces expériences permettent de conclure que les immunsérums de chèvre anti-mouton et de mouton anti-chèvre présentent des propriétés hémolytiques *in vivo*, et de considérer comme possible l'existence d'une anémie hémolytique naturelle chez les animaux pouvant provenir du croisement de ces deux espèces.

Au cours de l'immunisation d'un certain nombre de brebis et de chèvres, nous avons constaté que si certains animaux présentaient une évolution normale de leur gestation, chez d'autres, au contraire, il y avait une interruption de celle-ci.

Ainsi, le 8 novembre 1950, la brebis n° 5 a accouché prématu-

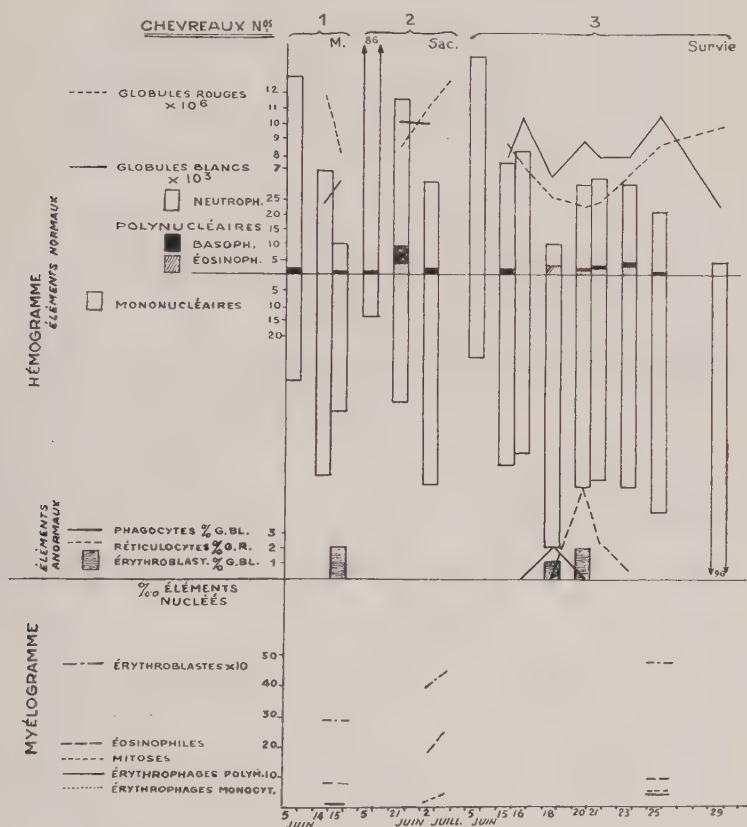


FIG. 2.

rément d'un fœtus mort non macéré, âgé de 5 mois environ, présentant un anasarque très accusé ; les caractéristiques de ce fœtus sont présentées dans le tableau ci-après.

La teinte de la peau de cet animal était normale, mais les muqueuses étaient pâles et jaunâtres et on constatait à la pression l'existence d'un œdème très important. La rate présentait un volume normal, mais le foie était hypertrophié, dégénéré, brunâtre et friable.

Le 2 décembre 1950, une brebis a accouché prématurément d'un fœtus macéré de 3 mois environ. La macération du fœtus a empêché d'effectuer les examens sérologiques. Les caractéristiques de cet animal sont données dans le tableau.

Le 25 janvier 1951, une autre brebis a accouché prématurément d'un fœtus macéré de 4 mois 1/2, dont la mort remontait à quatre ou cinq jours. La mère présentait dans son sérum une agglutinine active vis-à-vis des globules rouges du bélier avec lequel elle a été accouplée.

Bien que nous n'ayons pas encore pu apporter la preuve de l'étiologie immunologique de ces accidents, leur apparition chez des brebis iso-immunisées est assez significative pour être signalée.

En effet, les études de Drieux et Thiéry ont précisé que le placenta des Ovidés possède une structure syndesmochoriale de type intermédiaire entre les placentas décidus et indécidus, et doit de ce fait posséder une perméabilité notable.

| | FOETUS n° 1 | FOETUS n° 2 | FOETUS n° 3 |
|--|----------------|----------------|----------------|
| Longueur fronto-ischiale | 36 cm | 21 cm | 26 cm |
| Longueur scapulo-ischiale | 25 cm | 10 cm | 16 cm |
| Longueur occipito-incisive | 10 cm | 9 cm | 8 cm |
| Longueur calcanééo-unguénale | 12 cm | 9 cm | 8 cm |

BIBLIOGRAPHIE

- H. DRIEUX et G. THIÉRY. *Rec. Méd. Vétér.*, 1952, **128**, 5.
 R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, A. EYQUEM et P. MILLOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1448.
 R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, P. MILLOT et A. EYQUEM. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 1714.

**DÉVELOPPEMENT SPONTANÉ ET INDUIT
DES BACTÉRIOPHAGES
CHEZ DES
PSEUDOMONAS PYOCYANEA POLYLYSOGÈNES (*).**

par F. JACOB.

(*Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne.*)

INTRODUCTION.

Les bactéries lysogènes perpétuent héréditairement la propriété de produire des bactériophages [1], mais un petit nombre, seulement, de bactéries libère spontanément des phages. La production de phages par l'ensemble des bactéries de certaines souches lysogènes peut être déclenchée par l'action d'agents inducteurs divers, en particulier les rayons ultra-violet [2]. Toutefois, dans les cultures d'autres souches lysogènes, la production de phages n'est pas induite par l'action des rayons U. V. [3].

A la forme latente et non infectieuse du bactériophage qui est transmise à toutes les bactéries lysogènes, Lwoff et Gutmann [4] ont donné le nom de « prophage ». Il existe donc des souches lysogènes chez lesquelles le développement du prophage en phage peut être induit par les rayons U. V. et d'autres où il n'est pas induit.

On peut, artificiellement, faire des souches doublement lysogènes, c'est-à-dire des souches dont chaque bactérie perpétue deux types de prophages. Une telle souche, créée en infectant des bactéries successivement avec un phage provenant d'une souche lysogène inductible et un phage provenant d'une souche non inductible, permet de rechercher si la présence du premier phage rend ou non possible le développement du second après irradiation. Une autre souche, créée en infectant successivement les bactéries avec deux phages provenant chacun d'une souche inductible, et dont on sait qu'ils ne s'excluent pas, permet de rechercher si l'irradiation induit ou non le développement simultané

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

des deux phages. C'est le travail qui a été réalisé avec des souches de *Pseudomonas pyocyanea*.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

SOUCHES BACTÉRIENNES. — La souche indicatrice 13 a été décrite dans un mémoire précédent [5]. Les souches doublement lysogènes sont des souches rendues artificiellement lysogènes isolées en deux étapes : à partir de la souche 13(8) perpétuant le prophage 8, on a isolé des souches 13(8-1) perpétuant les prophages 8 et 1, et des souches 13(8-4) perpétuant les prophages 8 et 4. Les caractères des différentes souches sont résumés dans le tableau I.

TABEAU I. — Production de bactériophages par différentes souches de *P. pyocyanea* et sensibilité des souches aux bactériophages.

| Souches bactériennes | Phages libérés spontanément | Phages libérés après U.V. | Plages formées par les phages ^(°) | | |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--|---|---|
| | | | 1 | 4 | 8 |
| 13 | - | - | + | + | + |
| 13(1) | 1 | - | - | + | + |
| 13(4) | 4 | 4 | + | - | - |
| 13(8) | 8 | 8 | + | + | - |
| 13(8-1) | 8 + 1 | 8 | - | + | - |
| 13(8-4) | 8 + 4 | 8 + 4 | + | - | - |
| 01 | - | - | - | - | + |

(°) + le phage forme des plages sur la souche indiquée; — le phage ne forme pas de plages sur la souche indiquée.

BACTÉRIOPHAGES. — Les trois phages 1, 4 et 8 proviennent de trois souches lysogènes de la collection de l'Institut Pasteur. Ils forment tous trois des plages sur la souche 13. Ils ne peuvent être distingués par la forme des plages, mais seulement par leur spectre d'activité (voir tableau I). L'efficacité de l'étalement des trois phages sur la souche 13 et sur les diverses souches spécifiques est sensiblement la même, aux erreurs d'expérience près. Les phages 4 et 8 sont sérologiquement voisins (voir fig. 1). Le phage 1 n'est pas neutralisé par un sérum spécifique anti-8. Les phages 4 et 8 présentent la même résistance aux rayons U.V. (voir fig. 5), alors que le phage 1 y est plus sensible (voir fig. 3). Toutes les souches lysogènes simples étudiées jusqu'ici perpétuant soit le prophage 4, soit le prophage 8 peuvent être induites par

le rayonnement U. V. Aucune des souches perpétuant le prophage 1 ne peut être induite.

MILIEU DE CULTURE. — a) Tampon : KH_2PO_4 , 1,36 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,001 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00005 g ; eau, 1 000 g ; KOH, q.s.p. : pH 7,0.

b) Milieu complet : hydrolysate de caséine (N à 2 p. 1 000), 30 ml ; extrait de levure, 10 ml ; tampon, 60 ml.

IRRADIATION. — Les cultures en voie de croissance exponentielle sont diluées dans du tampon et soumises au rayonnement U. V.

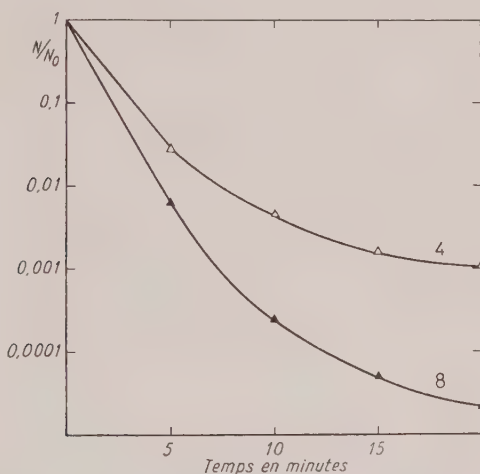


FIG. 1. — Action du sérum antibactériophage 8 sur les phages 8 et 4. A deux tubes contenant du sérum antibactériophage 8 dilué à 1/500, on ajoute soit du phage 8, soit du phage 4. Les mélanges sont placés à 37°. A temps variables, les échantillons sont dilués et étalés sur gélose avec la souche indicatrice. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction des phages donnant des plages. En abscisse, le temps en minutes.

pendant des durées variables. La lampe à rayons U. V. et les détails de l'irradiation ont été précédemment décrits [5]. Après l'irradiation, les suspensions bactériennes sont diluées dans du milieu complet et laissées cinquante minutes à 37° avant étalement pour éviter l'effet de réversion par étalement sur gélose [5].

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. CAS OU LE DÉVELOPPEMENT D'UN SEUL DES DEUX PHAGES PEUT ÊTRE INDUIT PAR IRRADIATION. — Toutes les souches lyso-

gènes 13 (8) isolées, perpétuant seulement le prophage 8, sont inductibles et les bactéries produisent du phage 8 après action des rayons U. V. Aucune des souches lysogènes 13 (1) isolées, perpétuant seulement le prophage 1, n'est inductible. Nous avons étudié les effets du rayonnement U. V. sur la souche 13 (8-1).

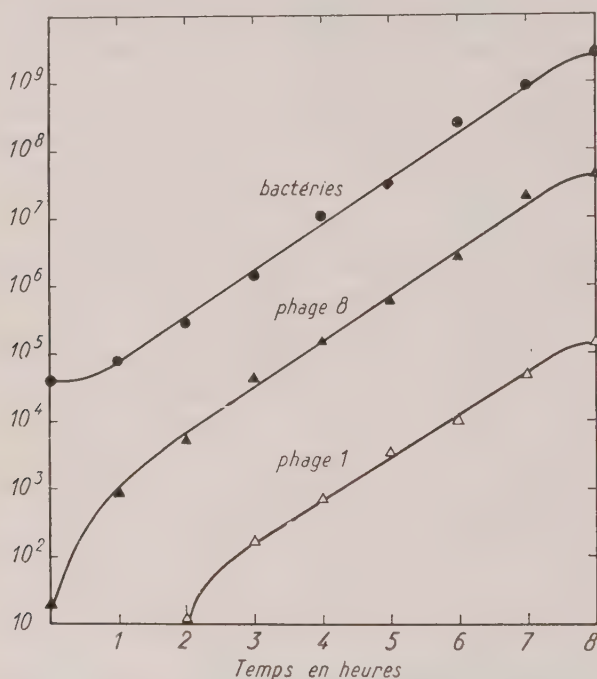


FIG. 2. — Libération spontanée des bactériophages 8 et 1 pendant la croissance des bactéries 13 (8-1). Une culture de 13 (8-1) est centrifugée et lavée pour éliminer la plupart des phages libres. Les bactéries sont mises en suspension dans du milieu levuré caséiné et agitées à 37°. Toutes les heures on prélève un échantillon à partir duquel on effectue : 1) un étalement des bactéries sur gélose ; 2) après centrifugation, un étalement du liquide surnageant avec chacune des souches indicatrices OA et 13 (8) qui révèlent respectivement les phages 8 et 1. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, le nombre de bactéries/ml formant des colonies et le nombre des phages 8 et 1 libres/ml. En abscisse, le temps en heures.

Toutes les bactéries de cette souche perpétuent le prophage 8 et le prophage 1, car les cultures provenant de colonies isolées produisent toujours les deux types de phages. Nous avons cherché à savoir si la présence d'un prophage « inductible » conférait l'inductibilité à un autre prophage « non inductible ».

Libération spontanée de phages. — Dans les cultures de 13 (8-1)

on trouve des phages libres appartenant aux deux types, dans la proportion de un phage 8 pour 50 bactéries et un phage 1 pour 7 000 à 8 000 bactéries environ (fig. 2). Il est facile de montrer que le phage 8 peut être libéré seul en utilisant la technique de Bertani [3], à la streptomycine. Les souches de *P. pyocyanea* utilisées sont résistantes à de petites concentrations de streptomycine (jusqu'à 50 μg par millilitre), mais pas à des concentrations plus élevées (500 à 1 000 μg par millilitre). Des souches OA S^r et 13 (8) S^r, résistantes à ces concentrations, ont été isolées.

Des bactéries provenant d'une culture de 13 (8-1) en phase exponentielle ont été centrifugées et lavées pour les débarrasser des phages libres, puis remises en suspension dans du milieu complet. Cette suspension a été diluée puis distribuée en tubes de manière à obtenir environ 80 bactéries par tube, et les tubes laissés au bain-marie pendant deux heures, ce qui correspond environ à 3 divisions dans les conditions de l'expérience. Une goutte de streptomycine à 1/100 est alors ajoutée à chacun des tubes. Le contenu de 50 tubes est étalé sur gélose avec la souche OA S^r en présence de 1 000 μg de streptomycine par millilitre. Seuls les phages 8 libres peuvent donner des plages. Le contenu de 50 autres tubes est étalé avec la souche 13 (8) S^r en présence de streptomycine : dans ces conditions, seuls les phages 1 libres donnent des plages. Les résultats de cette expérience, représentés sur le tableau II, montrent clairement que les bactéries 13 (8-1) qui se lysent spontanément peuvent produire des phages 8 sans produire de phages 1.

Les bactéries productrices de phage 1 produisent-elles ou non du phage 8 ? La probabilité par cycle de division pour qu'une bactérie produise du phage est beaucoup plus faible pour 1 que pour 8. On ne trouve donc de bactéries productrices de 1 qu'en présence d'un grand nombre de bactéries productrices de 8, ce qui empêche de réaliser les expériences nécessaires pour répondre à cette question.

Libération de phages après irradiation par un rayonnement U.V.

— Une culture de 13 (8-1) est irradiée avec des doses croissantes de rayons U.V. et les échantillons prélevés sont étalés, avant la lyse bactérienne, sur gélose avec les diverses souches indicatrices. On mesure ainsi pour chaque dose de rayons U.V. le nombre de bactéries productrices de phage 1 ou de phage 8. Les résultats sont exprimés par la figure 3 où sont également représentées les courbes de survie des phages 1 et 8 et la courbe de survie des bactéries 13 (8-1) [capacité de former des colonies]. On voit que pour des petites doses d'U.V., la fraction des bactéries productrices de 8 s'élève rapidement et dépasse 95 p. 100. Pour les doses plus fortes, cette fraction décroît exponentiel-

TABIEAU II. — Libération spontanée de bactériophages par des bactéries 13 (8-1). Une culture de 13 (8-1) en voie de croissance est diluée en milieu complet de manière à obtenir environ 130 bactéries/ml. La culture est répartie dans 100 tubes à raison de 0,5 ml par tube. Les tubes sont placés à 37° pendant deux heures, ce qui correspond à environ trois divisions. On ajoute alors à chaque tube de solution 1 goutte de streptomycine à 1 p. 100. 50 tubes sont étalés avec la souche OA S^r sur de la gélose contenant 1 000 µg de streptomycine/ml, ce qui révèle uniquement les phages 8 libres. 50 tubes sont étalés avec la souche 13 (8) S^r sur de la gélose à la streptomycine, ce qui révèle uniquement les phages 1 libres. Les boîtes contenant 1 ou 2 plages correspondent vraisemblablement à des tubes contenant du phage libre au début de l'expérience.

| | Étalement sur la souche indicatrice de | |
|---|--|-----------------------------------|
| | φ 1 | φ 8 |
| Nombre total de tubes | 50 | 50 |
| Tubes sans phage | 48 | 41 |
| Tubes avec 1 ou 2 phage | 2 | 3 |
| Tubes avec plus de 2 phages | 0 | 6 |
| | | (37 - 55 - 83 129 - 158 - 187) |
| Bactéries par tube au début de l'expérience (moyenne) : | | |
| " " " à la fin " " " : | | |
| Nombre de divisions | | > 3 |

lement avec la dose. Cette courbe est en tout point comparable à la courbe obtenue en irradiant des bactéries lysogènes 13 (8) qui perpétuent le seul prophage 8 (1).

La fraction des bactéries produisant spontanément des phages 1 après étalement est faible (moins de 1 p. 100). Cette fraction décroît rapidement avec de petites doses de rayons U. V. et la courbe de diminution est parallèle à la courbe de survie des bactéries. Pour les doses plus fortes, la courbe devient parallèle à la courbe de survie du phage 1. Ce résultat s'explique par le fait

(1) Contrairement aux phénomènes observés précédemment chez une autre souche lysogène [5], la courbe de survie des centres infectieux formés par les bactéries productrices de phages n'est pas ici parallèle à la courbe de survie du phage. Dans de très nombreuses souches de *P. pyocyanea*, en effet, le facteur limitant la reproduction du phage après irradiation semble être un facteur bactérien. Ce résultat ne peut être discuté ici et fera l'objet d'un mémoire ultérieur [Cf. 13].

que les plages de 1 produites spontanément sont formées par des colonies bactériennes dont quelques rares bactéries libèrent spontanément le phage 1. A mesure que la dose d'U. V. augmente, le nombre de bactéries capables de former des colonies décroît, et le nombre de plages 1 décroît parallèlement. Le segment de courbe

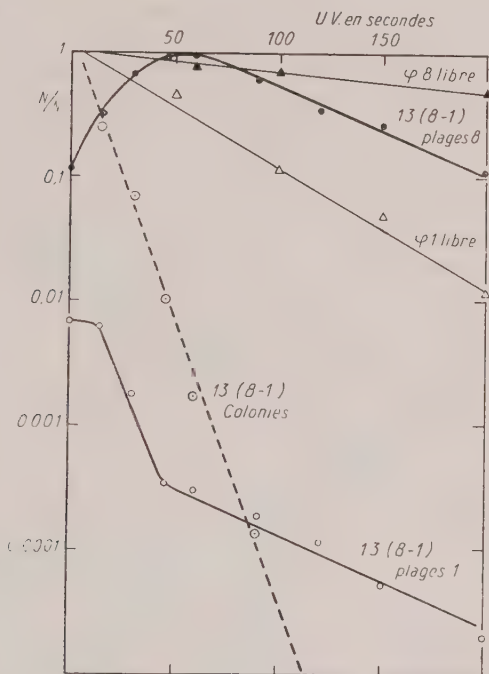


FIG. 3. — Action des rayons U. V. sur les bactéries 13 (8-1). Une culture en voie de croissance exponentielle est diluée à 1/100 dans du tampon et irradiée pendant des durées variables. Après chaque irradiation, des échantillons sont dilués dans du milieu complet et laissés cinquante minutes à 37°. Avant la lyse, des échantillons sont étalés sur gélose avec chacune des souches indicatrices OA et 13 (8). On a représenté également la courbe de survie des bactéries 13 (8-1) formant des colonies, et celles des phages libres 8 et 1. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction des bactéries produisant du phage 8, des bactéries produisant du phage 1, des bactéries formant des colonies, des phages libres 8 et 1 survivants. En abscisse, la dose des rayons U. V. en secondes.

parallèle à la courbe de survie du phage 1 correspond vraisemblablement à des phages libres restant en suspension dans la culture après centrifugation ou à des bactéries contenant déjà du phage 1 au moment de l'irradiation.

Il ressort donc de cette expérience qu'après irradiation, les

bactéries 13 (8-1) ne produisent pas de phage 1 et produisent du phage 8 comme si elles ne transportaient pas le prophage 1. Ce résultat ne peut s'expliquer par une exclusion de 1 par 8. En effet, les bactéries lysogènes 13 (8) irradiées, puis infectées par le phage 1 produisent en majorité le phage 1 et non le phage 8 (expériences inédites).

De l'ensemble de ces expériences, on peut conclure que le

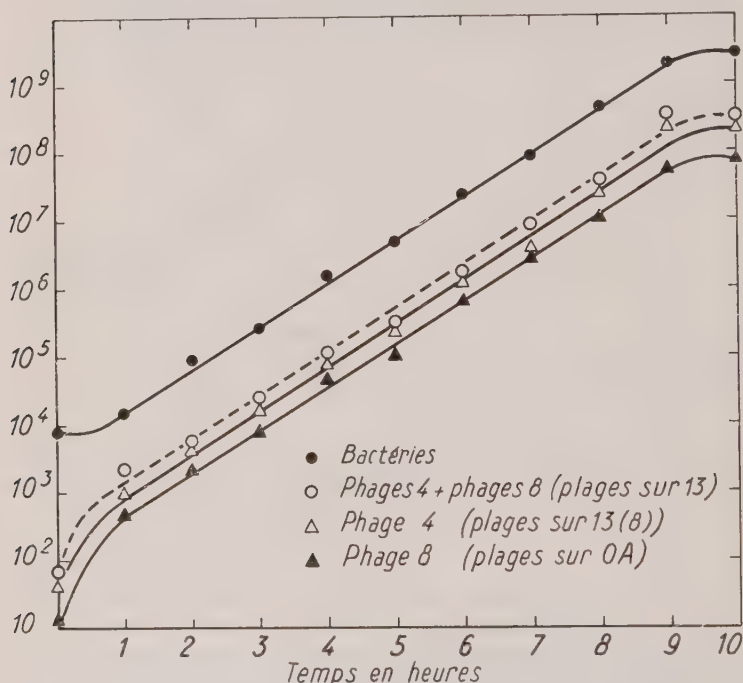


FIG. 4. — Libération spontanée de bactériophages 8 et 4 pendant la croissance des bactéries 13 (8-4). Une culture de 13 (8-4) est centrifugée et lavée pour éliminer la plupart des phages libres. Les bactéries sont mises en suspension dans du milieu levuré caséiné et agité à 37°. Toutes les heures, on prélève un échantillon à partir duquel on effectue : 1) un étalement des bactéries sur gélose ; 2) après centrifugation un étalement du liquide surnageant avec chacune des souches indicatrices : 13 qui révèle les deux types de phages, OA et 13 (8) qui révèlent respectivement les phages 8 et 4 libres. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, le nombre de bactéries/ml formant des colonies, le nombre total de phages libres, ml et le nombre de phages 8 et 4 libres/ml. En abscisse le temps en heures.

développement du prophage 1 n'est pas induit par le rayonnement U.V., et que cette propriété n'est pas modifiée par la présence du prophage 8 dont le développement est au con-

traire induit par l'irradiation, dans les mêmes conditions qu'en l'absence du prophage 1 qui n'exerce donc pas d'effet dépressif. Les résultats sont les mêmes avec la souche 13 (1-8), chez laquelle l'infection par le phage 1 a précédé l'infection par le phage 8.

II. CAS où LE DÉVELOPPEMENT DES DEUX PHAGES PEUT ÊTRE INDUIT PAR IRRADIATION. — Toutes les souches lysogènes simples étudiées perpétuant soit le prophage 4, soit le prophage 8 peuvent être induites par exposition aux rayons U.V. Ces deux phages ne s'excluent pas, c'est-à-dire peuvent être produits simultanément après infection de la même bactérie par les deux phages. Nous avons cherché à savoir si le développement des deux phages peut être induit séparément ou non dans la souche 13 (8-4).

Libération spontanée de phages par les bactéries. — Dans les cultures de la souche 13 (8-4), on trouve les deux types de phages à raison de deux phages 4 et un phage 8 pour environ 30 bactéries (fig. 4).

Les bactéries qui se lysent spontanément produisent-elles un seul ou les deux types de phages ? Pour répondre à cette question la technique de Bertani à la streptomycine, utilisée précédemment, a été modifiée légèrement : la suspension de bactéries centrifugées et lavées est diluée puis distribuée en tubes à raison de 0,1 ml par tube. Après un séjour de deux heures à 37° et addition de streptomycine le contenu de chaque tube est aspiré dans une pipette effilée. Une moitié est déposée à la surface d'une boîte de gélose à la streptomycine ensemencée avec la souche OAS^r, ce qui permet de déceler uniquement les phages 8 libres. L'autre moitié est déposée à la surface d'une boîte de gélose à la streptomycine ensemencée avec la souche 13 (8) S^r, ce qui permet de déceler les phages 4 libres. Les résultats de deux expériences de ce type sont représentés sur le tableau III. On voit que dans la majorité des tubes contenant du phage, il n'y a qu'un seul type de phage, et que le nombre de tubes contenant du phage 4 seul est à peu près le double de celui des tubes contenant du phage 8 seul. Mais le nombre de tubes contenant à la fois les deux types de phages est, dans les deux expériences, très supérieur au nombre de tubes supposés contenir plus d'une bactérie productrice, en admettant que ces bactéries productrices soient réparties dans les tubes selon une distribution de Poisson.

Une fraction importante des bactéries productrices de phages libère donc simultanément les deux types de phages. La production spontanée de chacun des phages ne se comporte pas comme un événement indépendant de l'autre. En effet, comme la probabilité de produire du phage par bactérie et par cycle de division

TABLEAU III. — Libération spontanée de bactériophages par les bactéries 13 (8-4). Une culture de 13 (8-4) en voie de croissance est centrifugée et les bactéries sont lavées pour éliminer la plupart des phages libres. Les bactéries sont remises en suspension et cette suspension est diluée dans du milieu complet, de manière à obtenir environ 500 ou 300 bactéries/ml. Cette suspension est distribuée en tubes à raison de 0,1 ml par tube. Les tubes sont laissés deux heures à 37°. On ajoute alors à chaque tube une microgoutte de solution de streptomycine à 1/100. Le contenu de chaque tube est ensuite aspiré dans une pipette et déposé moitié sur une boîte de gélose contenant 1 000 μ g de streptomycine/ml etensemencée avec la souche OA S^r, ce qui révèle les phages 8 libres, moitié sur une boîte à la streptomycine ensemencée avec la souche 13 (8) S^r, ce qui révèle les phages 4 libres.

| | Exp. n° 1 | Exp. n° 2 |
|---|-----------|-----------|
| Nombre total de tubes | 220 | 216 |
| Bactéries par tube au début de l'expérience (moy.) | 52 | 33 |
| " " " à la fin " " " | 393 | 287 |
| Nombre de divisions | < 3 | > 3 |
| Tubes sans phage | 168 | 182 |
| Tubes avec φ 4 seul | 23 | 16 |
| Tubes avec φ 8 seul | 15 | 8 |
| Tubes avec φ 4 + φ 8 | 14 | 10 |
| Nombre de tubes qui devraient contenir plus d'une bactérie productrice de phages, d'après la distribution de Poisson. | 6 | 3 |

est de l'ordre de $\frac{1}{900}$ pour le phage 4, et de $\frac{1}{1\ 800}$ pour le phage 8, si ces deux événements étaient indépendants, la probabilité de produire les deux ensemble serait environ $\frac{1}{1\ 620\ 000}$.

On ne devrait alors pas trouver de bactéries produisant les deux types de phages dans les expériences du type décrit sur le tableau III.

En résumé, environ 1 bactérie 13 (8-4) sur 600 produit spontanément du phage. De ces bactéries productrices, près de 50 p. 100 produisent seulement du phage 4, 25 à 30 p. 100 seulement du phage 8 et 20 à 25 p. 100 les deux types à la fois. La production spontanée de phages semble donc relever de facteurs complexes aboutissant à la libération, soit d'un seul type de phage, soit des deux types.

Libération de phages après irradiation. — Le développement des deux phages 4 et 8 peut être induit par irradiation d'une culture de 13 (8-4), mais les résultats obtenus varient avec la dose d'U. V. Dans l'expérience représentée par le tableau IV et la figure 5, une suspension de bactéries a été irradiée avec des doses croissantes. Avant la lyse bactérienne, des échantillons ont été étalés sur gélose avec les trois souches indicatrices : 13 qui révèle les bactéries productrices de phage 4 ou 8, 13(8) qui révèle les productrices de phage 4 et OA qui révèle les productrices de 8. On voit sur le tableau IV qu'avec les irradiations de

TABLEAU IV. — **Production de phages par les bactéries 13 (8-4) irradiés par les rayons U. V.** Une culture de 13 (8-4) en voie de croissance est diluée à 1/100 dans du tampon et irradiée pendant des temps variables. Après chaque dose, un échantillon est dilué dans du milieu complet et laissé à 37° jusqu'à la cinquantième minute. Avant la lyse bactérienne des échantillons sont étalés sur gélose avec chacune des souches indicatrices : 13 qui révèle les deux phages, OA qui révèle le phage 8 et 13 (8) qui révèle le phage 4.

| Dose U.V. en sec. | Producteurs de 4 ou 8 (étalement sur 13) | | Producteur de 4 (étalement sur 13(8)) | | Producteur de 8 (étalement sur OA) | |
|--|---|-------|--|-------|---------------------------------------|-------|
| | plages (moy.) | N/No | plages (moy.) | N/No | plages (moy.) | N/No |
| 0 | 71.10 ⁵ | 0,045 | 32.10 ⁵ | 0,02 | 21.10 ⁵ | 0,013 |
| 15 | 64.10 ⁶ | 0,4 | 45.10 ⁶ | 0,28 | 21.10 ⁶ | 0,13 |
| 30 | 139.10 ⁶ | 0,87 | 91.10 ⁶ | 0,57 | 62.10 ⁶ | 0,39 |
| 45 | 159.10 ⁶ | 0,79 | 137.10 ⁶ | 0,86 | 113.10 ⁶ | 0,71 |
| 60 | 162.10 ⁶ | 1 | 160.10 ⁶ | 1 | 147.10 ⁶ | 0,93 |
| 90 | 112.10 ⁶ | 0,7 | 89.10 ⁶ | 0,56 | 93.10 ⁶ | 0,58 |
| 120 | 88.10 ⁶ | 0,55 | 57.10 ⁶ | 0,36 | 69.10 ⁶ | 0,43 |
| 150 | 62.10 ⁶ | 0,39 | 41.10 ⁶ | 0,26 | 39.10 ⁶ | 0,25 |
| 200 | 25.10 ⁶ | 0,16 | 23.10 ⁶ | 0,14 | 22.10 ⁶ | 0,14 |
| 250 | 132.10 ⁵ | 0,082 | 117.10 ⁵ | 0,073 | 101.10 ⁵ | 0,063 |
| 300 | 79.10 ⁵ | 0,049 | 63.10 ⁵ | 0,040 | 52.10 ⁵ | 0,033 |
| 350 | 37.10 ⁵ | 0,023 | 29.10 ⁵ | 0,018 | 30.10 ⁵ | 0,019 |
| 400 | 19.10 ⁵ | 0,012 | 12.10 ⁵ | 0,008 | 14.10 ⁵ | 0,009 |
| Étalement témoin de colonies : 160 x 10 ⁶ | | | | | | |

Erratum. — Sur le tableau IV, 4^e ligne, 3^e colonne, lire : 0,97 au lieu de 0,79.

quinze et trente secondes, la somme des centres infectieux produits sur les deux souches spécifiques OA et 13 (8) est égale ou seulement légèrement supérieure au nombre de centres infectieux

produits sur la souche 13 sensible aux deux phages. Avec les irradiations plus longues (soixante secondes et plus), le nombre des centres infectieux observés sur chacune des souches spécifiques n'est qu'à peine inférieur à celui observé sur la souche non spécifique 13. On peut donc conclure de cette expérience que les doses faibles provoquent le développement d'un seul type de

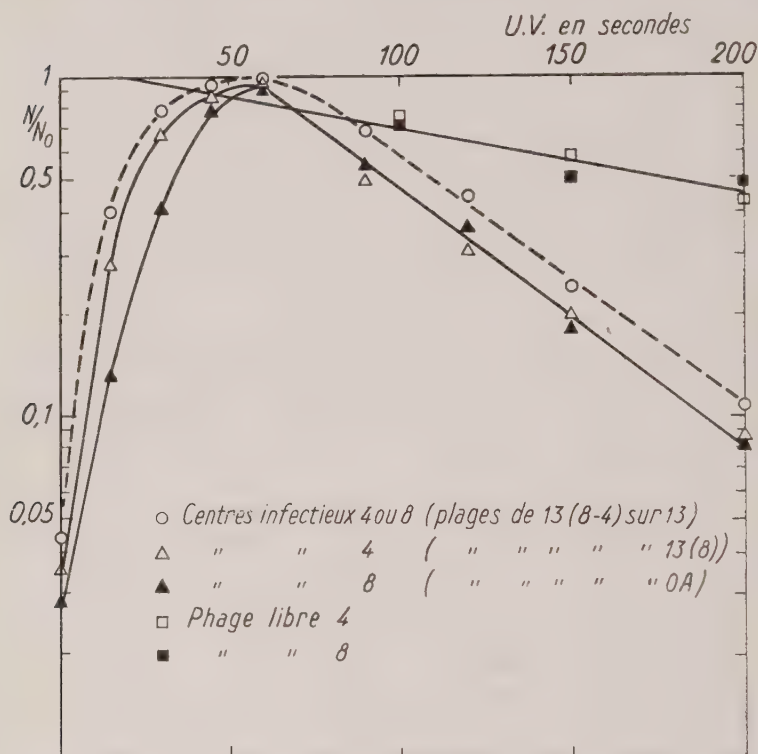


FIG. 5. — Action des rayons U. V. sur les bactéries 13 (8-4). Expérience analogue à celle décrite sur le tableau IV. On a représenté également la courbe de survie des phages 8 et 4 libres. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction des bactéries produisant du phage (8 ou 4), des bactéries produisant du phage 8, des bactéries produisant du phage 4, des phages 8 et 4 libres survivants. En abscisse les doses d'U. V. en secondes.

phage par bactérie induite, tandis que les doses fortes entraînent le développement simultané des deux types de phages dans la même bactérie. Cette expérience montre également que le développement du phage 4 est plus aisément induit, c'est-à-dire par des doses plus faibles, que le développement du phage 8. Au contraire, l'inactivation des centres infectieux par des doses fortes

est sensiblement la même pour les deux types de phages, comme on le voit sur la figure 5 (*).

La différence observée entre les effets des petites et des grandes doses d'U. V. peut être confirmée par l'étude de bactéries isolées. Dans l'expérience représentée sur le tableau V, une suspension de 13 (8-4) a été irradiée pendant dix secondes (A) ou soixante-dix secondes (B). Les deux fractions ont alors été réparties en tubes de manière à obtenir dans les deux cas environ 1 bactérie productrice de phages pour 3 ou 4 tubes. Les tubes sont laissés trois heures à 37°, ce qui permet aux bactéries induites de se lyser. La moitié de chacun des tubes est alors étalée sur chacune des deux souches indicatrices spécifiques. On voit que pour la faible dose de rayons U. V., 13 tubes sur 52 contenaient un seul type de phage et 4 contenaient les deux types. Si les bactéries productrices de phages étaient réparties dans les tubes suivant une distribution de Poisson, 3 tubes devraient contenir plus d'une bactérie productrice. On voit aussi qu'avec la plus forte dose d'U. V., 14 tubes contenaient les deux types de phages et 2 n'en contenaient qu'un seul. Ici aussi le calcul de la distribution de Poisson donne 3 tubes contenant plus d'une bactérie productrice.

Ces résultats confirment l'expérience précédente. Les bactéries irradiées avec une petite dose de rayons U. V. produisent en général un seul type de phage. On voit que le nombre de bactéries produisant du phage 4 est deux fois plus élevé que le nombre de bactéries produisant du phage 8. La plupart des bactéries irradiées avec une dose forte produisent les deux types de phages.

On a indiqué également, sur le tableau V, les rendements unitaires moyens. On voit que le rendement moyen total diminue lorsque les bactéries sont plus fortement irradiées. Toutefois, cette diminution n'affecte pas également les deux types de phages, puisque le rendement moyen en phage 4 passe de 180 à 37, tandis que le rendement en phage 8 passe de 116 à 101.

Ce résultat est confirmé par les deux expériences « à cycle unique » représentées sur la figure 6. Une suspension de 13 (8-4) est irradiée pendant dix secondes (A) ou soixante-dix secondes (B). Les cultures sont diluées et agitées à 37°. Des échantillons, prélevés à temps variables, sont étalés sur gélose avec chacune des

(*) Ce dernier résultat s'explique par le fait que le facteur bactérien limitant la survie des complexes [Cf. 13] est le même pour les deux types de phages. Aux très grandes doses d'U. V. les courbes de survie des centres infectieux, qui deviennent parallèles aux courbes de survie des phages libres, se dissocient à nouveau à raison d'environ deux phages 4 pour un phage 8. On mesure alors la survie des centres infectieux formés par les bactéries contenant déjà du phage au moment de l'irradiation, et l'on a vu qu'une bactérie a deux fois plus de chance de produire spontanément du phage 4 que du phage 8.

TABLEAU V. — Libération de phages par des bactéries 13 (8-4) irradiées avec deux doses U.V. (expérience de bactéries isolées). Une culture de 13 (8-4) en voie de croissance est diluée à 1/100 dans du tampon. Une fraction A est alors irradiée pendant dix secondes. Une autre B est irradiée pendant soixante-dix secondes. Les deux suspensions A et B sont diluées dans du milieu complet de manière à obtenir environ 1 bactérie induite par 3 ou 4 ml. Ces suspensions sont alors distribuées en tubes à raison de 1 ml/tube et laissées à 37° pendant cent cinquante minutes (A) et cent quatre vingt minutes (B), temps auxquels toutes les bactéries induites se sont lysées. Les tubes sont ensuite étalés, moitié sur une boîte de gélose avec la souche 6A, qui révèle le phage 8, moitié sur une autre boîte avec la souche 13 (8) qui révèle le phage 4.

| | | U.V. 10 sec. | | U.V. 70 sec. | |
|---|--|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------|
| | | 0,29 0,21 0,10 | | 0,97 0,91 0,94 | |
| Fraction des bact. produisant $\phi 8$ ou $\phi 4$ " " " $\phi 8$ " " " " " " " $\phi 4$ | | | | | |
| Nombre total de tubes | | 52 | | 51 | |
| Tubes sans phages | | 35 | | 35 | |
| Tubes avec $\phi 4$ seul Rendement | | 8 | 181 (36 à 294) | 0 | |
| Tubes avec $\phi 8$ seul Rendement | | 5 | 116 (47 à 304) | 2 | 125 (106 à 144) |
| Tubes avec $\phi 8 + \phi 4$ Rendement en $\phi 4$ Rendement en $\phi 8$ | | 4 | 37 à 518 192 à 342 | 14 | 34 (12 à 96) 101 (18 à 180) |
| Nombre de tubes qui devraient contenir plus d'une bactérie productrice, | | 3 | | 3 | |

trois souches indicatrices. Pour les deux fractions A et B, chaque courbe de la figure 6 représente, en fonction du temps, le nombre relatif de centres infectieux mesuré sur une seule des souches indicatrices. On voit qu'avec la dose faible, le rendement en phage 4 (195) est un peu supérieur au rendement en phage 8 (159), et que le rendement observé sur la souche 13 (186), qui indique indifféremment les deux types de phages, correspond sensi-

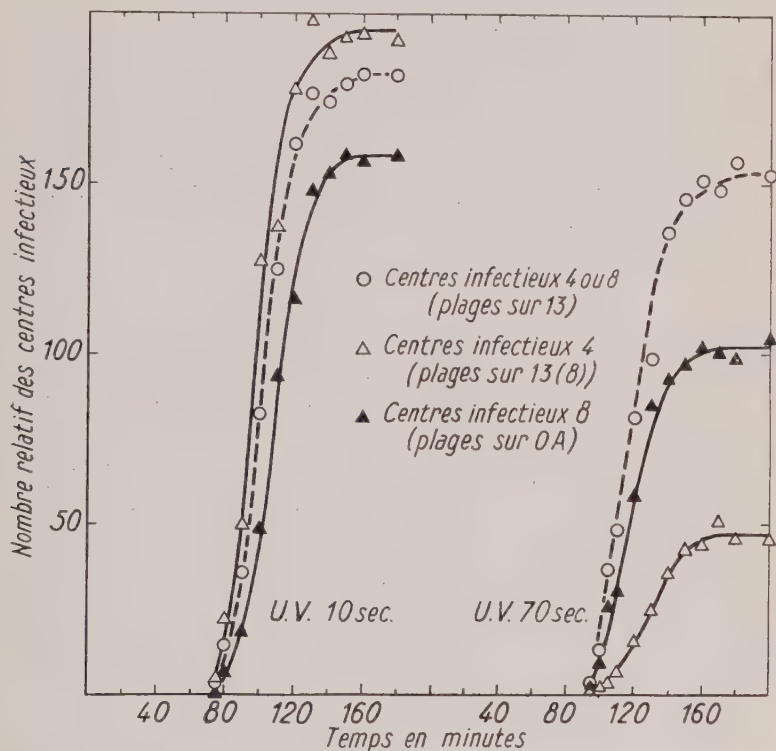


FIG. 6. — Production de bactériophages par les bactéries 13 (8-4) irradiées avec deux doses de rayons U.V. (expérience à cycle unique). Une culture de 13 (8-4) en voie de croissance exponentielle, contenant $1,2 \cdot 10^8$ bactéries/ml est diluée dans du tampon. Une fraction (A) est irradiée pendant dix secondes. Une fraction (B) pendant soixante-dix secondes. Les fractions A et B sont alors diluées dans du milieu complet de manière à obtenir dans chaque cas, environ 1 000 bactéries induites/ml (1^{er} tube) et 10/ml (2^e tube). Les quatre tubes sont agités à 37°. A temps variable, des échantillons sont étalés sur gélose avec chacune des souches indicatrices : 13 qui révèle les deux phages 8 ou 4, OA qui révèle seulement le phage 8 et 13 (8) qui révèle le phage 4. En ordonnée, le nombre relatif des centres infectieux observés sur une des souches indicatrices. En abscisse, le temps en secondes. Chaque courbe représente donc les résultats obtenus sur une seule souche indicatrice.

blement à une *moyenne* des deux rendements individuels en phage 4 et en phage 8. C'est le résultat que l'on doit obtenir si les bactéries induites ne produisent qu'un seul type de phage. Avec la dose forte, au contraire, le rendement en phage 4 (47) est beaucoup plus diminué que le rendement en phage 8 (112). Le rendement total (152) observé sur la souche 13 correspond à la *somme* des deux rendements individuels. C'est le résultat que l'on doit obtenir si les bactéries induites produisent simultanément les deux types de phages.

La fraction des bactéries produisant les deux types de phages variant selon la dose de rayons U. V., on peut chercher à calculer si l'induction de chacun des prophages se comporte comme un événement indépendant de l'autre. La meilleure démonstration de cette hypothèse serait de vérifier que, pour des doses variables de rayons U. V., la probabilité d'induire à la fois le développement des deux phages est le produit des probabilités d'induire séparément chacun d'eux, soit :

$$p_{8+4} = p_8 \cdot p_4.$$

Pour être démonstratif, ce calcul devrait être vérifié pour les bactéries induites par des doses faibles. Mais, dans ces conditions, les erreurs d'échantillonnage faites en étalant séparément les prélèvements sur les trois souches indicatrices sont trop importantes. La seule technique qui pourrait donner des résultats relativement sûrs est celle des « mélanges d'indicateurs ». Malheureusement, pour des raisons diverses, les tentatives effectuées dans ce sens n'ont pas encore abouti. Nous avons donc utilisé un autre type de calcul. Appelons p_4 la probabilité pour qu'avec une dose donnée de rayons U. V. une bactérie produise le phage 4, et p_8 la probabilité pour qu'elle donne le phage 8. La probabilité de ne pas donner 4 sera $1 - p_4$. Celle de ne pas donner 8 sera $1 - p_8$. La probabilité p_0 pour une bactérie de ne donner aucun phage sera :

$$p_0 = (1 - p_4)(1 - p_8) \quad (1)$$

$$= 1 - p_4 - p_8 + p_4 p_8 \quad (2)$$

La probabilité p_+ de donner n'importe quel type de phage sera

$$\begin{aligned} p_+ &= 1 - p_0 \\ &= p_4 + p_8 - p_4 p_8. \end{aligned} \quad (3)$$

On peut mesurer p_+ , p_4 et p_8 , qui correspondent, pour chaque dose d'U. V., à la fraction des bactéries produisant des plages respectivement sur les souches 13, 13 (8) et OA.

Une expérience de ce genre, ainsi que les calculs sont résumés dans le tableau VI. On voit que la correspondance entre p_+ mesurée expérimentalement et p_+ calculée est assez bonne, compte

tenu des erreurs d'échantillonnage et de l'existence des plages formées spontanément par une fraction des bactéries non induites. Cette expérience a été plusieurs fois répétée avec des résultats comparables. Il semble donc bien qu'après irradiation de la souche 13 (8-4) par un rayonnement U. V. le développement de chacun des phages soit induit indépendamment de celui de l'autre.

DISCUSSION.

On sait depuis longtemps que les bactéries lysogènes peuvent perpétuer le pouvoir de produire plusieurs types de phages. Les expériences de Bertani sur *E. coli* Lisbonne [3] ont montré que chaque bactérie produisant spontanément du phage n'en libère qu'un seul type. Nos expériences sur les souches doublement lysogènes de *P. pyocyanea* confirment que des prophages différents, présents dans une même bactérie, conservent leur individualité. Le déclenchement du développement de chacun des prophages après irradiation se comporte comme un événement indépendant de l'autre. Comme le seul caractère étudié sur les phages libérés est leur spectre d'activité à l'égard de trois souches indicatrices, nos résultats n'excluent pas la possibilité de recombinaison génétique, soit pendant la reproduction des prophages, soit pendant leur développement. Un système tel que la souche 13 (8-4) offrirait un matériel favorable pour une étude de ce genre si l'on conférait aux phages d'autres caractères.

Quels renseignements sur le mécanisme de l'induction peut-on tirer des expériences sur les souches doublement lysogènes ? Il est clair que l'irradiation ne déclenche pas obligatoirement le développement de tous les prophages inductibles présents dans la bactérie, mais que le développement de chacun des prophages peut se faire indépendamment du développement de l'autre dans la souche 13 (8-4). Deux hypothèses peuvent être envisagées pour l'induction :

a) Les rayons U. V. agissent sur le prophage, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'une substance produite dans la bactérie. Le prophage est une « cible » pour les rayons ou les molécules de médiateur. Dans cette hypothèse, l'effet primaire est hétérogène et distribué. Il est évident que le développement de chacun des prophages sera induit indépendamment de celui de l'autre.

b) Les rayons U. V. agissent sur les bactéries et modifient l'équilibre de certaines réactions (arrêt de la synthèse d'un acide nucléique, par exemple). Le développement du prophage n'est qu'un événement secondaire dont la probabilité dépend de l'état métabolique atteint par la bactérie. Dans cette hypothèse, l'événement primaire est homogène, mais il est parfaitement

concevable que les événements secondaires ne le soient pas (en supposant, par exemple, que le développement du prophage exige une concentration donnée d'un métabolite rendu disponible par l'irradiation et que ce métabolite est inégalement distribué dans la bactérie).

Quant à la différence de sensibilité des prophages 8 et 4 à l'induction, elle peut s'expliquer, suivant les hypothèses, par la taille des prophages, leur multiplicité, leur affinité pour le médiateur ou les métabolites, leur structure, leur situation dans la bactérie, etc. Il est également possible que chacun des prophages corresponde à un stade différent du cycle du phage, ces stades présentant des sensibilités variables à l'induction par les rayons U. V.

Les résultats de nos expériences ne permettent pas de choisir entre les hypothèses proposées : chacune d'elles permet d'expliquer le fait que les petites doses de rayons U. V. provoquent le développement de l'un ou l'autre phage, tandis que les grandes doses entraînent le développement simultané des deux.

Pourquoi certains systèmes lysogènes sont-ils inductibles et d'autres pas ? L'inductibilité semble souvent être une propriété du prophage. En effet, les bactéries artificiellement lysogènes, créées en infectant une souche sensible et en isolant les colonies résistantes, sont ou non inductibles suivant que le phage utilisé provient d'une souche inductible ou d'une souche non inductible. Ces résultats ont été trouvés aussi bien chez *Bacillus megatherium* [6] que chez *P. pyocyanea*. Ils sont confirmés par le fait que dans la souche 13(8-1) le prophage 8 seul est inductible et non le prophage 1 dont le développement n'a jusqu'ici jamais été déclenché dans aucune souche par l'irradiation.

Cependant, en infectant la souche *E. coli* 122 par des phages λ , produits par la souche lysogène inductible K12 (λ) [voir 7], on obtient des souches lysogènes 122 (λ) dont certaines sont inductibles et d'autres pas [8]. Il semble donc que, dans certains cas, l'inductibilité soit une propriété, soit de la bactérie, soit du système lysogène, c'est-à-dire de la façon dont est établi l'équilibre entre le prophage et la bactérie-hôte.

On dit qu'un système lysogène est inductible lorsque son irradiation est suivie de synthèses létales pour les bactéries et entraînant leur lyse. En infectant des bactéries sensibles avec des phages provenant d'une souche inductible, on isole le plus souvent les clones lysogènes inductibles. Toutes les bactéries se lysent après irradiation, mais la fraction des bactéries produisant du phage varie de 10^{-4} à 1 suivant les clones [5, 9]. Les phages issus d'un clone dont peu de bactéries produisent du phage peuvent redonner des clones dont la totalité des bactéries produit des phages après irradiation. Les différences entre les clones sont

donc des propriétés non des phages mais des bactéries ou des systèmes lysogènes. Dans le cas des bactéries qui se lysent sans produire de phages, le développement amorcé par l'irradiation est abortif, à moins que ces bactéries ne produisent des phages que les souches indicatrices employées ne détectent pas. Le cas extrême semble être celui de certaines souches d'*E. coli* ou de *P. pyocyanea*, chez lesquelles les bactéries se lysent après irradiation et produisent une substance de nature protéique douée d'une action antibiotique spécifique [10].

Il convient d'examiner le problème des rapports possibles entre la production spontanée et la production induite par irradiation. Il est remarquable que, contrairement aux résultats observés sur *E. coli* Lisbonne [3], la production spontanée par la souche 13 (8-4) puisse aboutir à la libération soit de l'un ou l'autre type de phage, soit des deux à la fois. Ces expériences révèlent une tendance à l'association dans la production spontanée de phages par cette souche. Les causes primaires de la production spontanée peuvent être :

a) une mutation du prophage ;

b) une modification de la bactérie, soit par mutation, soit par perturbation phénotypique du métabolisme.

L'hypothèse a n'est pas en accord avec les résultats trouvés. En effet, elle entraîne une indépendance absolue dans la production de chacun des phages. La probabilité pour une bactérie de produire spontanément les deux phages devrait être inférieure à 10^{-6} alors que les valeurs trouvées sont de l'ordre de $5 \cdot 10^{-4}$. L'hypothèse d'une mutation du prophage semble donc pouvoir être écartée, du moins comme cause primaire de la production spontanée par la souche 13 (8-4). Ceci est en contradiction avec les conclusions tirées par Boyd, d'expériences effectuées sur des souches lysogènes de *Salmonella* [14].

On sait [11, 12] que certaines substances sont capables d'induire la production de phages par les bactéries lysogènes inductibles, en particulier certains peroxydes. Il est possible que, chez un petit nombre de bactéries, un changement du métabolisme, d'origine génotypique ou phénotypique, provoque l'apparition d'une telle substance inductrice. Suivant l'importance des changements, la substance inductrice pourrait apparaître en plus ou moins grande quantité, ce qui provoquerait le développement soit des deux prophages, soit d'un seul. Le mécanisme du développement spontané des prophages chez les bactéries inductibles serait ainsi comparable à celui du développement induit.

Si cette conclusion est exacte, il doit exister un rapport entre la fréquence de la production spontanée, c'est-à-dire la probabilité pour une bactérie par cycle de division de produire du phage, et l'inductibilité des souches. C'est bien ce qui semble se

passer pour les souches de *P. pyocyanea*. Si l'on examine plusieurs souches lysogènes artificielles perpétuant le même prophage, les souches où la fréquence de la production spontanée est la plus élevée sont précisément celles où l'efficacité inductrice de l'irradiation est la plus grande. Dans la souche 13(8-4) une petite dose de rayons U.V. induit la formation de phage 4 chez 2 bactéries quand elle induit la formation de phage 8 chez 1 bactérie. Or, on trouve que la libération spontanée du phage 4 est deux fois plus fréquente que celle du phage 8.

Cette relation est encore plus accentuée entre systèmes inductibles et non inductibles. Chez *P. pyocyanea*, la fréquence de la production spontanée pour les souches non inductibles est beaucoup plus faible que pour les souches inductibles. Avec la souche 13(8-1), la probabilité pour une bactérie, par cycle de division, de produire le phage inductible 8 est d'environ 10^{-3} , tandis que la probabilité de produire le phage non inductible 1 est de l'ordre de 10^{-5} . Dans les systèmes non inductibles, les modifications, qui chez les systèmes inductibles entraînent le développement du phage, sont inefficaces. Les systèmes non inductibles exigent, pour produire du phage, des modifications différentes des précédentes, peu ou pas sensibles à l'irradiation et dont la rareté évoque celle des mutations bactériennes généralement étudiées.

RÉSUMÉ.

1° Des souches lysogènes artificielles ont été isolées en infectant la souche indicatrice 13 de *Pseudomonas pyocyanea* avec divers bactériophages. Les prophages 4 et 8 sont inductibles, c'est-à-dire que les souches 13(4) perpétuant le prophage 4, et 13(8) perpétuant le prophage 8, produisent des bactériophages après irradiation par le rayonnement ultra-violet. Le prophage 1 n'est pas inductible, car les souches 13(1) ne produisent pas de phages après irradiation.

2° Une souche 13(8-1), dont chaque bactérie perpétue les prophages 8 et 1, a été isolée. Ces bactéries peuvent spontanément produire du phage 8 sans produire de phage 1.

Après irradiation par un rayonnement U.V., plus de 95 p. 100 des bactéries produisent du phage 8 sans produire de phage 1. L'irradiation n'augmente pas la fraction des bactéries productrices de 1.

3° Une souche 13(8-4), dont chaque bactérie perpétue les prophages 8 et 4 a été isolée. Ces deux phages sont sérologiquement voisins et peuvent se multiplier simultanément dans une même bactérie.

Parmi les bactéries 13(8-4) qui produisent spontanément du phage (1 bactérie sur 600 par cycle de division), environ 50 p. 100

produisent seulement du phage 4, 25 à 30 p. 100 seulement du phage 8 et 20 à 25 p. 100 à la fois les phages 8 et 4.

En irradiant les bactéries avec des doses faibles de rayons U. V. qui induisent la production de phages chez 20 à 30 p. 100 des bactéries, les bactéries induites produisent soit du phage 8, soit du phage 4. Il y a environ deux productrices de phage 4 pour une productrice de phage 8.

Après irradiation par des doses plus fortes de rayons U. V. qui induisent la formation de phages chez plus de 95 p. 100 des bactéries, 90 p. 100 des bactéries produisent simultanément les deux phages.

Après irradiation, le développement de chacun des phages se comporte comme un événement indépendant de l'autre.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. M. BURNET et M. McKIE. *Austr. J. exp. Biol.*, 1929, **6**, 277.
- [2] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815.
- [3] G. BERTANI. *J. Bact.*, 1951, **62**, 293.
- [4] A. LWOFF et A. GUTMANN. *Ces Annales*, 1950, **78**, 711.
- [5] F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **82**, 433.
- [6] H. IONESCO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1702.
- [7] J. J. WEIGLE et M. DELBRUCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [8] E. WOLLMAN. Communication personnelle.
- [9] A. LWOFF et L. SIMINOVITCH. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1397.
- [10] F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 298.
- [11] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2238.
- [12] A. LWOFF et F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2308.
- [13] S. BENZER et F. JACOB. In *Colloque du bactériophage*. Royau-mont, 1952. *Ces Annales* (sous presse).
- [14] J. S. K. BOYD. In *Symposium on nature of virus reproduction*. Oxford, 1952 (sous presse).

FORMATION DE TOXINE TÉTANIQUE PAR DES SUSPENSIONS DE CORPS MICROBIENS

par M. RAYNAUD, R. SAISSAC, A. TURPIN et M. ROUYER (*).

(*Institut Pasteur. Annexe de Garches.*)

INTRODUCTION.

L'un d'entre nous [1] a montré que l'on pouvait extraire la toxine tétanique à partir des corps microbiens lavés. La quantité de toxine extractible est d'autant plus faible que les corps microbiens sont plus âgés. A la fin de la période de croissance active, on n'arrive cependant à extraire des corps microbiens par les méthodes utilisées, qu'une partie seulement de la quantité totale de toxine que l'on peut obtenir avec le même milieu dans les conditions optimales de la toxinogénèse. Nous avons cherché à réaliser des conditions expérimentales qui permettent d'obtenir, en dehors de toute croissance ou division cellulaire, la formation optimale de toxine tétanique. Dans ces conditions, la croissance résiduelle éventuelle des germes tétaniques à 33° ou à 35° est certainement supprimée. La libération de la toxine par les suspensions microbiennes est alors en rapport seulement avec des processus physiques ou chimiques, se produisant dans les corps microbiens et indépendants de la multiplication cellulaire.

TECHNIQUES.

Les cultures ont été faites en milieu à base de digestion peptique et papaïnique de viande de bœuf préparé selon Prévot et Boersma [2] dans des conditions précisées antérieurement [3], avec cependant une légère modification. Après addition de 1 g de globules rouges secs de cheval pour 4,5 l. de milieu, on précipite ce dernier par chauffage à 120° pendant vingt minutes. Le précipité formé est éliminé par filtration sur papier ; on

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 juillet 1952.

ajoute 8 g p. 1 000 de glucose et on stérilise à 110° pendant trente minutes. La filtration est rendue nécessaire pour l'obtention de milieux clairs, indispensables pour la détermination turbidimétrique de la croissance.

Les souches employées sont les souches R [3] et Harvard (H. Mueller).

La dose minima mortelle a été déterminée sur souris de 18-20 g en prenant les précautions classiques [3]. Etant donné les variations observées dans la formation de toxine sur le milieu employé, lorsque des prélèvements de germes sont effectués à divers âges, on effectue ces prélèvements dans un ballon de grande capacité (4,500 l) : le volume enlevé est alors de peu d'importance par rapport au volume total. La culture est prolongée pendant onze jours pour avoir le taux de toxine final.

Pour étudier l'influence de l'arrêt de croissance sur la formation de toxine, nous avons opéré de la façon suivante :

Le milieu clair précédent est réparti en tubes de Hall à raison de 7 cm³ par tube. Chaque tube estensemencé avec 0,1 cm³ d'une culture de bacilles tétaniques âgés de 18 heures et effectuée à 35° en tubes scellés sous vide. Les tubes de Hall sont alors placés dans un bain-marie à 35°. Onensemence 100 tubes par expérience et on prélève à divers intervalles des lots de 4 tubes dont on mélange le contenu pour limiter l'influence des variations individuelles de tube à tube. On effectue la mesure de la densité optique des suspensions ainsi obtenues au photomètre de Meunier, en employant l'écran vert, après dilution appropriée (1/5 et 1/10) dans l'eau physiologique. Les résultats sont rapportés en unités arbitraires (nombre de divisions du photomètre de Meunier déterminé expérimentalement, multiplié par le taux de dilution).

Par ailleurs, on a déterminé dans quelques cas le nombre de germes vivants par ensemencement de dilutions des cultures ou des suspensions en milieu liquide et en gélose profonde.

RÉSULTATS.

1° ADDITION DE SULFATE D'OXYQUINOLÉINE A DES PHASES VARIABLES DE LA CROISSANCE. CULTURES EN TUBES DE HALL. — Nous avons recherché l'action de divers antiseptiques sur la formation de toxine. Nous avons ajouté les antiseptiques choisis à des lots de 6 tubes de Hall, à concentration suffisante pour arrêter la croissance, et nous avons ensuite laissé les tubes au bain-marie de façon que la durée totale du séjour à 35° soit de six jours. On dose alors la toxine dans les tubes témoins sans antiseptique et dans les tubes avec antiseptique. Le sulfate d'oxyquinoléine au 1/400, l'orthophénanthroline au 1/10 000 nous ont donné de bons

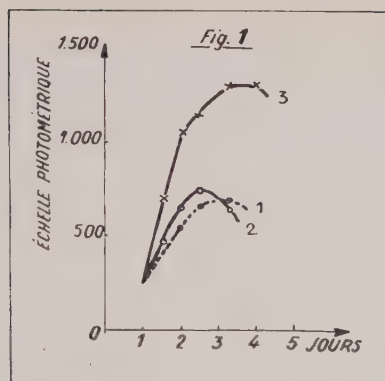


FIG. 1. — Courbes de croissance de *Pl. tetani* (souche Harvard) en tubes de Hall. Diamètre des tubes : 14 mm. Diamètre de l'étranglement : 6 mm. Volume de liquide 7 ml. La surface libre est à 1 cm au-dessus de l'étranglement. Ensemencement : 0,1 cm³ d'une culture âgée de 17 heures. Les tubes sont ensuite placés au bain-marie à 35°. En ordonnées : divisions du photomètre de Meunier.

TABLEAU I.

Le tableau I montre l'influence de l'addition d'oxyquinoléine à des dates variables de la croissance. Les taux de toxine, exprimés en nombre de DMm par millilitre, ont tous été déterminés au sixième jour. L'oxyquinoléine a été ajoutée :

A la 41^e heure de culture. Colonne a.
A la 46^e heure de culture. Colonne b.
A la 65^e heure de culture. Colonne c.

| | Date du prélèvement | Densité (*) | Témoin sans oxyquinoléine | Tubes additionnés d'oxyquinoléine | | |
|---------------------|------------------------|-------------|------------------------------|--------------------------------------|----------------|----------------|
| | | | | a | b | c |
| <u>Expérience 1</u> | 23 h | 300 | $3 \cdot 10^2$ | - | - | - |
| | 46 h | 520 | 10^4 | - | - | - |
| | 65 h | 685 | $5 \cdot 10^4$ | - | - | - |
| | 6 jours | 360 | $1,5 \cdot 10^6$ | - | $3 \cdot 10^5$ | $4 \cdot 10^5$ |
| <u>Expérience 2</u> | 22 h | 260 | 10^2 | - | - | - |
| | 41 h | 655 | 10^4 | - | - | - |
| | 46 h | 620 | $2 \cdot 10^4$ | - | - | - |
| | 64 h | 665 | 10^5 | - | - | - |
| | 70 h | 585 | 10^5 | - | - | - |
| | 6 jours | 510 | $4 \cdot 10^5$ | 10^5 | $5 \cdot 10^4$ | $4 \cdot 10^5$ |
| <u>Expérience 3</u> | 46 h | 1160 | $5 \cdot 10^3$ | - | - | - |
| | 64 h | 1240 | $5 \cdot 10^4$ | - | - | - |
| | 6 jours | 780 | 10^5 | - | $2 \cdot 10^4$ | 10^5 |

(*) Les chiffres correspondent aux graduations du photomètre Meunier.

résultats, arrêtant la croissance et laissant persister la toxinogénèse. Nous avons retenu le sulfate d'oxyquinoléine d'activité plus régulière pour l'ensemble de nos expériences.

On ajoute par tube de Hall, contenant 8 cm³ de milieu, 0,2 cm³ d'une solution de sulfate d'oxyquinoléine à 10 p. 100. Le pH du milieu est ramené à la neutralité (pH = 7,0) par addition de soude stérile.

A la concentration employée et dans le milieu utilisé, l'oxyquinoléine exerce une action bactériostatique certaine, que nous avons vérifiée de la façon suivante :

On prélève 1 ml de la culture trente minutes après addition d'oxyquinoléine et on ensemence 1 ml en tubes scellés (contenant 5 ml de bouillon) et en gélose profonde. Aucune culture ne se manifeste. La concentration résiduelle de sulfate d'oxyquinoléine dans ces subcultures (environ 1/2 000) suffit donc à empêcher tout développement à partir d'un inoculum important (10⁷ à 10⁸ germes).

A la dose de 1 p. 400, le sulfate d'oxyquinoléine exerce même une action bactéricide importante. Nous avons déterminé cette activité dans quelques cas et après trois heures de contact avec une culture de trois jours dans les conditions indiquées, nous avons constaté que le nombre de germes vivants passait de 10⁷ par centimètre cube à 10 par centimètre cube.

Les résultats de trois de ces expériences sont rapportés ci-dessous (fig. 1 et tableau I). La figure 1 représente les courbes de croissance. On peut noter les variations très importantes qui peuvent survenir d'une expérience à l'autre et qui expliquent les précautions prises pour l'établissement de la culture témoin sans addition d'antiseptiques. L'action de ceux-ci ne peut être mise en évidence que par rapport à une culture effectuée dans des conditions rigoureusement identiques : même lot de bouillon, même culture d'ensemencement et mêmes conditions de température, etc.

On constate que la croissance dans les conditions de l'expérience (35°, tube de Hall) est lente, le maximum étant atteint au bout de deux à trois jours.

Lorsque la croissance est arrêtée trop tôt au cours de cette phase, le nombre de germes est peu élevé et le taux de toxine final reste faible. Lorsque l'oxyquinoléine est ajoutée trop tard, une quantité importante de toxine a déjà diffusé dans le milieu et l'augmentation de toxine observée n'est pas élevée.

Si, par contre, on ajoute l'oxyquinoléine un peu avant que soit atteint le maximum de la croissance, on peut mettre en évidence une augmentation importante de toxine en présence de cet antiseptique.

Ces résultats semblaient indiquer que, lorsque la culture du bacille tétanique est effectuée à 35°, toute la toxine se trouve bien élaborée à la fin de la période de croissance exponentielle. Elle passe ensuite dans le milieu à la faveur d'un processus de synthèse liés à la division cellulaire. Il devait donc être possible de trouver des conditions expérimentales empiriques telles que l'on puisse obtenir, à partir d'une suspension bactérienne non proliférante, des quantités de toxine égales à celle qui se forme dans la culture témoin.

Il fallait, pour cela, prélever les germes à un stade déterminé de leur croissance. Les échecs antérieurs dans cette voie paraissaient liés au fait que dans les conditions de la culture en grand (ballon de 4,500 l, surface libre au contact de l'air, etc.), la croissance présente des variations de ballon à ballon et qu'il faut opérer dans des conditions strictes pour pouvoir comparer l'activité des suspensions à celle de la culture témoin.

L'addition de sulfate d'oxyquinoléine à des dates variables, à certains ballons, les autres ballons servant de témoin, ne nous avait donné que des résultats irréguliers : dans certains cas, le taux de toxine augmentait, dans d'autres cas, il ne changeait pas, sans que l'on puisse prévoir l'évolution observée.

2° EXTRACTION DE LA TOXINE A PARTIR DE CORPS MICROBIENS PRÉLEVÉS A DES PHASES VARIABLES DE LA CROISSANCE. — Nous avons opéré de la façon suivante :

Un ballon de 5 l contenant 4,500 l de milieu estensemencé avec 20 ml d'une culture de bacille tétanique, effectuée à 33°, âgée de 48 heures. On effectue des prélèvements à intervalles réguliers après agitation des ballons pour obtenir une suspension homogène. On effectue une première mesure de la densité optique de la suspension, puis on recueille les germes par centrifugation. On les remet ensuite en suspension dans un volume plus faible d'eau physiologique. On mesure à nouveau la densité optique de la suspension, au photomètre de Meunier. On observe de légères différences dans les valeurs trouvées en rapport avec les pertes de corps microbiens au cours des centrifugations. On détermine aussi dans quelques cas le nombre de germes vivants dans ces suspensions. Puis après addition de sulfate d'oxyquinoléine (1/10 000) ou de pénicilline (1 000 unités par centimètre cube), on replace la suspension à 33° pendant sept jours, cette durée ayant été trouvée optimale dans une série d'expériences préalables. On détermine le taux de toxine passée en solution (après filtration sur bougie) au début (suspension de départ) et après sept jours à 33°.

Une précaution importante est à prendre. Il faut filtrer le

liquide après dilution au 1/10 dans de l'eau peptonée salée. Si on filtre le liquide non dilué, la quasi totalité de la toxine est retenue ou détruite sur la bougie (bougie Chamberland L3). Une solution contenant 50 à 100 000 DMm peut, après une filtration directe, ne plus contenir même une DMm.

Lorsqu'on emploie la pénicilline, on détermine aussi la densité de la suspension finale (après sept jours à 33°).

Avec l'oxyquinoléine comme antiseptique, cette détermination finale n'a pas été faite, car cette substance provoque une agglutination des germes qui empêche l'obtention d'une suspension homogène.

Les résultats sont rapportés aux tableaux II, III, IV et exprimés en nombre de DMm par millilitre (expériences T₄₂, T₄₄, T₄₆). Dans les expériences T₄₂ et T₄₄, on a employé la pénicilline. La détermination du nombre de germes vivants a été effectuée dans les expériences T₄₄ et T₄₆ au début et à la fin du séjour à 33° des suspensions. Le nombre de germes vivants dans les suspensions était, au départ, du même ordre de grandeur que dans le bouillon. Après sept jours à 33°, et dans tous les cas, lesensemencements de la suspension pure sont restés stériles, démontrant que la quasi totalité des germes étaient morts.

Nous avons essayé, par ailleurs, de réaliser la lyse bactérienne par action des rayons ultra-violets. Une suspension de bacilles tétaniques, placée dans une boîte de Petri de 15 cm de diamètre sous le volume de 20 cm³, a été exposée, pendant dix minutes, au rayonnement d'une lampe à ultra-violet Gallois (type 143-100).

Distance de la lampe à la suspension : 70 cm.

TABLEAU II. — **Expérience T₄₂. Souche Tétanos R.**

Dans cette expérience, les germes ont été repris dans un volume d'eau physiologique égal au 1/6 du volume de bouillon prélevé.

| | <u>Bouillon</u> | | <u>Suspension</u> | | | |
|----------|-----------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------|
| | <u>Densité</u> | <u>Toxine</u> | <u>Début</u> | | <u>(après 7 jours à 35°)</u> | |
| | | | <u>Densité</u> | <u>Toxine</u> | <u>Densité</u> | <u>Toxine</u> |
| 3 jours | 635 | 2 x 10 ⁴ | 3.500 | 2 x 10 ⁴ | 1000 | 5 x 10 ⁵ |
| 4 jours | 820 | 10 ⁵ | 4.900 | 10 ⁵ | 1900 | 10 ⁶ |
| 5 jours | 960 | 2 x 10 ⁵ | 5.700 | 2 x 10 ⁵ | 2200 | 1,5 x 10 ⁶ |
| 6 jours | 1050 | 2 x 10 ⁵ | 4.900 | 2 x 10 ⁵ | - | - |
| 7 jours | 680 | 2 x 10 ⁵ | 3.500 | 2 x 10 ⁵ | 1500 | 1,5 x 10 ⁶ |
| 11 jours | 730 | 2 x 10 ⁵ | 3.400 | 2 x 10 ⁵ | 2600 | 2 x 10 ⁵ |

TABLEAU III. — Expérience T₄₄. Souche Tétanos R.

Les germes ont été repris dans un volume d'eau physiologique égal au volume de bouillon initial.

| <u>Bouillon</u> | | | | <u>Suspension</u> | | | |
|-----------------|----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | | | <u>Début</u> | <u>après 7 jours</u> | | |
| | <u>Densité</u> | <u>Nbre de germes vivants</u> | <u>Toxine</u> | <u>Densité</u> | <u>Nbre de germes vivants</u> | <u>Toxine</u> | <u>Toxine</u> |
| 3 jours | 620 | 3×10^7 | 2×10^4 | 605 | 2×10^7 | 2×10^4 | 4×10^5 |
| 4 jours | 690 | 6×10^7 | 2×10^4 | 680 | - | 2×10^4 | 4×10^5 |
| 5 jours | 720 | - | 10^5 | 650 | - | 3×10^4 | 5×10^5 |
| 6 jours | 560 | 3×10^6 | 2×10^5 | 550 | - | 6×10^4 | 2×10^5 |
| 7 jours | 560 (460) | $1,7 \times 10^6$ | 5×10^5 | 510 | - | 6×10^4 | - |
| 11 jours | 560 | $2,6 \times 10^6$ | 5×10^5 | 560 | 2×10^6 | 4×10^4 | 5×10^4 |

TABLEAU IV. — Expérience T₄₆. Souche Tétanos R.

| <u>Bouillon</u> | | | | <u>Suspension départ</u> | | <u>Suspension après 7 jours à 33°.</u> | |
|-------------------------|----------------|-------------------------------|---------------|--------------------------|---------------|--|--------------------|
| <u>Jours de culture</u> | <u>Densité</u> | <u>Nbre de germes vivants</u> | <u>Toxine</u> | <u>Densité</u> | <u>Toxine</u> | <u>Oxygène</u> | <u>Pénicilline</u> |
| 3 | 500 | 2.10^7 | 10^4 | 560 | 5.10^3 | 2.10^4 | 10^5 |
| 4 | 770 | $1,8.10^7$ | 2.10^4 | 780 | 10^4 | 2.10^5 | 10^5 |
| 5 | 720 | 7.10^6 | 5.10^4 | 620 | 2.10^4 | 10^5 | 2.10^5 |
| 6 | - | - | 2.10^5 | - | 6.10^4 | 5.10^4 | 5.10^4 |
| 7 | 660 | 7.10^6 | 2.10^5 | 520 | 3.10^4 | 10^4 | 3.10^4 |
| 11 | 630 | 4.10^6 | 2.10^5 | 500 | 10^3 | 10 | 10 |

Le contrôle du taux de mortalité en fonction du temps d'irradiation a fourni les résultats suivants :

| <u>DURÉE D'IRRADIATION</u> | <u>NOMBRE de germes vivants par centimètre cube</u> |
|----------------------------|---|
| 0 seconde | $5,2.10^7$ |
| 5 secondes | $3,2.10^6$ |
| 20 secondes | 10^6 |
| 60 secondes | 6.10^5 |
| 5 minutes | 50 |
| 10 minutes | 1 à 10 |

L'action des rayons ultra-violetes n'a pas permis d'obtenir, dans les conditions indiquées, de libération de toxine plus complète que par les autres méthodes.

Les suspensions de germes contiennent toujours, dès leur préparation, des quantités non négligeables de toxine. Cette toxine provient, soit des traces de bouillon retenu par les germes, soit d'une toxine faiblement liée aux corps microbiens qui passe rapidement dans le milieu extérieur.

Cette toxine faiblement liée est la seule que l'on trouve dans les suspensions de bactéries âgées (onzième jour). Par séjour à 33° pendant huit jours en présence d'oxyquinoléine ou de pénicilline, ces suspensions ne libèrent aucune quantité supplémentaire de toxine tétanique.

Les suspensions de corps microbiens jeunes se comportent de façon toute différente. Par séjour à 33° en présence d'oxyquinoléine ou de pénicilline, les germes âgés de 3 à 7 jours sont capables de libérer des quantités importantes de toxine. En présence de pénicilline, cette libération s'accompagne d'une lyse considérable.

Pour obtenir, avec des suspensions bactériennes, autant de toxine que dans la culture témoin, il faut cependant prélever les germes à une certaine période bien déterminée, un peu avant que soit atteint le maximum de la croissance (ici entre le cinquième et le septième jour).

La quantité absolue de germes formés n'intervient pas seule pour expliquer ce phénomène, quoiqu'elle joue un rôle important, d'ailleurs prévisible, dans le rendement final en toxine. Il faut aussi, pour obtenir à partir d'une suspension de germes, la quantité maxima de toxine, que les corps microbiens aient été prélevés dans une population arrivée à un certain état physiologique.

Pour éliminer l'influence de la quantité absolue de germes et ne laisser subsister que les manifestations des différences qualitatives, nous avons effectué l'expérience suivante :

Expérience T₆₁. — La culture a été faite dans les mêmes conditions (milieu, récipient, ballon de 4,500 l, etc.) que précédemment. Les prélèvements ont été effectués aux troisième, quatrième, cinquième, sixième, septième, neuvième, onzième jours. Après centrifugation de 200 cm³ de culture, les corps microbiens ont été remis en suspension dans de l'eau distillée et la densité microbienne ramenée, dans chaque cas, à une valeur fixe, correspondant à 320 graduations (écran vert 540) du photomètre Klett-Summerson. La mesure est faite en tubes calibrés stériles.

Sur une partie aliquote de cette suspension, on a déterminé le poids sec des germes. Le nombre de germes total a été mesuré directement à l'hématimètre. Il y a une bonne concordance entre

la courbe photométrique et la courbe en nombre de germes par millilitre jusqu'au cinquième jour. Jusqu'à cette date, les bacilles tétaniques sont dans le milieu considéré, d'apparence normale, et leur taille n'est pas trop variable : petits bâtonnets de 8 à 10 μ de long.

A partir du sixième jour, les numérations sont difficiles. Les germes sont irréguliers, des formes filamenteuses apparaissent, de même que des formes petites, granuleuses, et l'appréciation de la masse de matière vivante formée d'après le nombre de bactéries devient fausse.

Les valeurs de la densité optique fournissent une appréciation plus juste tout au long de la période d'observation.

La suspension dense réalisée en eau distillée est alors diluée de façon à obtenir une densité optique correspondant à 200 divisions du Klett. Les valeurs du rapport du volume final de la suspension au volume de bouillon prélevé sont rapportées dans le tableau VI.

La dilution est faite en présence de sels ou de pénicilline, de façon à réaliser les milieux suivants (concentrations finales) :

- 1° NaCl 9 p. 1 000 + pénicilline, 500 unités par millilitre ;
- 2° NaCl M/1, citrate M/10 ;
- 3° NaCl M/1, citrate M/10 + pénicilline, 500 unités par millilitre.

Un prélèvement est alors effectué et on titre la toxine après élimination des corps microbiens.

Les suspensions sont placées à diverses températures :

- les suspensions 1 et 3 à 33° ;
- la suspension 2 à 0°.

On effectue des titrages après trois jours et six jours pour les suspensions 1 et 3, après six jours pour la suspension 2 maintenue à 0°.

Les résultats sont rapportés aux tableaux V et VI et à la figure 2.

Le tableau VI montre de façon très nette que des suspensions trop jeunes (deuxième, quatrième, cinquième jours) ou trop âgées (neuvième et onzième jours), quoique ramenées à la même densité, sont incapables de libérer des quantités de toxine égales à celles que l'on obtient lorsque les germes sont laissés en contact avec le bouillon.

Les suspensions âgées contiennent une toxine peu liée qui est libérée dès le premier contact avec le liquide extracteur : il n'y a pas d'augmentation au cours du séjour à 33° ou à 0°.

Les suspensions jeunes libèrent, par contre, au cours de ce même séjour, des quantités importantes de toxine : le taux de toxine varie de 1 à 10. Mais la quantité totale reste inférieure à l'optimum, les germes n'étant pas dans l'état physiologique

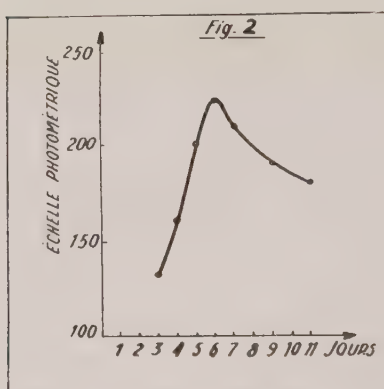


FIG. 2. — Courbe de croissance de *Pl. tetani* (souche R.). Ballon de 5 l. En ordonnées, graduation du photomètre Klett-Summerson (écran vert 540), après déduction du témoin approprié. La courbe est établie d'après les chiffres du tableau V.

TABLEAU V. — **Expérience T₆₁. Souche R.**

Bouillon tétanos filtré pH = 5,8. Culture 33°. Suspension en eau distillée, préparée à partir du troisième jour de culture et ramenée à une valeur fixe : 320 divisions du photomètre Klett-Summerson (écran 540).

| Jours | Bouillon | | Suspension (départ) | | | |
|-------|------------|------------------|---------------------|------------|------------------|----------------------|
| | Photomètre | Numération(*) | Toxine D.M.M./ml | Photomètre | Numération(*) | Poids sec g/litre |
| 3 | 132 | $2,4 \cdot 10^8$ | $2 \cdot 10^3$ | 326 | — | 1,66 |
| 4 | 163 | $3,5 \cdot 10^8$ | 10^4 | 327 | $6,6 \cdot 10^8$ | 1,44 |
| 5 | 202 | $4,9 \cdot 10^8$ | $5 \cdot 10^4$ | 328 | $6,7 \cdot 10^8$ | 1,43 |
| 6 | 225 | $4,2 \cdot 10^8$ | — | 327 | — | 1,66 |
| 7 | 213 | $4,4 \cdot 10^8$ | $2 \cdot 10^5$ | 320 | — | 1,55 |
| 9 | 192 | $2 \cdot 10^8$ | $2 \cdot 10^5$ | 319 | $5,7 \cdot 10^8$ | 1,43 |
| 11 | 182 | 10^8 | $4 \cdot 10^5$ | 300 | $2,3 \cdot 10^8$ | 1,37 |

(*) Nombre total de germes par millilitre, déterminé à l'hématimètre.

requis, la toxine ou la substance-mère de la toxine n'ayant pas atteint dans les germes sa concentration maxima.

Les germes prélevés au sixième et au septième jour, c'est-à-dire un peu avant ou un peu après qu'ait été atteint le maximum de la croissance, libèrent par contre une quantité de toxine voisine de la quantité totale. La substance-mère de la toxine ou

TABLEAU VI. — Expérience T₆₁.

Suspension : 200 divisions du Klett-Summerson-6,6 à $6.7.10^8$ germes/ml :
 a, toxine : DMm/ml. b, toxine totale correspondant à 1 l de culture, calculée :
 en prenant la valeur la plus forte obtenue en 1, 2 ou 3, au troisième ou
 sixième jour. 1, eau physiologique et pénicilline à 33°. 2, NaCl M/1. Citrate
 M/10 0° 3, pénicilline + NaCl M/1. Citrate M/10 33°.

| Jours | Bouillon | Concentration | N° | Départ | 3 jours | 6 jours | | Densité de |
|-------|------------|---------------|----|----------|----------|-----------------|------------|---------------|
| | D.M.K. | (*) | | a | a | a | b | la suspension |
| | pour 1 | | | | | | | au 6ème jour |
| | litre | | | | | | | |
| 3 | 2.10^6 | 0,66 | 1 | 2.10^3 | 5.10^3 | - | - | - |
| | | | 2 | 10^3 | - | 10 ⁴ | $6,6.10^6$ | - |
| | | | 3 | 2.10^3 | 10^4 | - | - | - |
| 4 | 10^7 | 1,0 | 1 | 2.10^3 | 5.10^4 | 2.10^4 | - | 92 |
| | | | 2 | 5.10^3 | - | 5.10^4 | 5.10^7 | 84 |
| | | | 3 | 5.10^3 | 5.10^4 | 5.10^4 | - | 60 |
| 5 | 5.10^7 | 1,2 | 1 | 10^4 | 5.10^4 | 5.10^4 | - | 70 |
| | | | 2 | 10^4 | - | 5.10^4 | 6.10^7 | 83 |
| | | | 3 | 2.10^4 | 5.10^4 | - | - | 57 |
| 6 | (2.10^8) | 1,2 | 1 | 2.10^4 | 10^5 | $< 5.10^4$ | - | 82 |
| | | | 2 | 2.10^4 | - | 10^5 | $1,2.10^8$ | 61 |
| | | | 3 | 2.10^4 | 10^5 | $< 10^5$ | - | 63 |
| 7 | 2.10^8 | 1,2 | 1 | 2.10^4 | 10^5 | 5.10^4 | - | 82 |
| | | | 2 | 2.10^4 | - | - | $1,2.10^8$ | 58 |
| | | | 3 | 2.10^4 | 10^5 | 10^5 | - | 78 |
| 9 | 2.10^8 | 1,2 | 1 | 2.10^4 | 2.10^4 | $< 5.10^4$ | - | 105 |
| | | | 2 | 5.10^4 | - | 5.10^4 | 6.10^7 | 86 |
| | | | 3 | 5.10^4 | 5.10^4 | 5.10^4 | - | 83 |
| 11 | 4.10^8 | 1,0 | 1 | 3.10^4 | 3.10^4 | $< 3.10^4$ | - | - |
| | | | 2 | 3.10^4 | - | 2.10^4 | 2.10^7 | 143 |
| | | | 3 | 3.10^4 | 3.10^4 | 2.10^4 | - | 124 |

(*) Rapport du volume final de la suspension au volume de bouillon prélevé.

la toxine est donc à sa concentration maxima dans les germes, à la fin de la croissance. Un équilibre s'établit alors entre la toxine qui a diffusé dans le milieu extérieur et la toxine présente dans les corps microbiens.

Dans les expériences T₄₂ et T₄₄, c'était vers le cinquième jour que cet équilibre était le plus favorable à la mise en évidence de la toxine dans les corps microbiens. A ce stade, on pouvait obtenir à partir d'une suspension bactérienne autant de toxine que dans le milieu après onze jours à 33°.

Le déficit dans les bilans que nous avons signalé dans notre mémoire antérieur [1] est donc dû au fait que seuls les germes parvenus à un certain état physiologique contiennent la toxine

au maximum possible de concentration, compatible avec le milieu de culture utilisé.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

Si l'on prélève les corps microbiens tétaniques à une certaine phase de leur croissance, il est possible d'obtenir en suspensions non proliférantes, en présence de pénicilline ou de sulfate d'oxyquinoléine, la formation d'une quantité importante de toxine tétanique. On arrive ainsi avec des suspensions microbiennes à produire autant de toxine que dans une culture effectuée dans des conditions optimales pour l'obtention de la toxine.

Le passage de la toxine dans le milieu extérieur est un processus indépendant de la croissance. Sa nature exacte n'est pas pour autant précisée. Il peut s'agir, soit d'une augmentation de perméabilité liée à la mort de la cellule, soit d'un processus biochimique beaucoup plus complexe de lyse bactérienne au cours duquel la toxine, engagée dans la cellule dans une combinaison chimique stable, serait libérée lentement sous forme soluble.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. RAYNAUD. Ces *Annales*, 1951, **80**, 356.
- [2] A.-R. PRÉVOT et H. G. BOORSMA. Ces *Annales*, 1939, **63**, 600.
- [3] A. TURPIN, M. RAYNAUD et M. ROUYER. Ces *Annales*, 1952, **82**, 299.

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'ÉLIMINATION RÉNALE SUR L'ANTIGÉNICITÉ DES PROTÉIDES

par CLAUDE LAPRESLE (*) et PIERRE GRABAR (**).

(*Institut Pasteur. Service de Chimie Microbienne.*)

On sait depuis les classiques travaux de Bayliss, et de Bott et Richard que le rein se comporte vis-à-vis des protéides comme un filtre laissant passer ceux dont le poids moléculaire est inférieur à 70 000, retenant au contraire dans la circulation ceux dont le poids moléculaire est supérieur à 70 000.

Cette élimination rénale des protéides de faible poids moléculaire se retrouve au cours de l'immunisation [1] et Haurowitz [3] a tenté d'expliquer en partie, grâce à elle, la non-antigénicité de la gélatine.

Le but de ce travail est d'étudier ce retentissement éventuel de l'élimination des protéides sur leur antigénicité en comparant, suivant différents modes d'immunisation, l'élimination urinaire et l'antigénicité de deux protéides : l'Ovalbumine et la γ -Globuline humaine, de poids moléculaire respectivement au-dessous et au-dessus du seuil de filtration rénale.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

I. ANTIGÈNES. — 1° Ovalbumine préparée par précipitation du blanc d'œuf de poule par le sulfate d'ammonium à 50 p. 100. L'électrophorèse dans le tampon phosphate + ClNa, pH 7,6, force ionique 0,2 a montré l'existence de deux constituants principaux : Ovalbumine, 75 p. 100 ; Conalbumine, 12 p. 100.

2° γ -Globuline humaine (1) préparée par la technique de Cohn (précipitation par l'alcool à froid). L'électrophorèse dans le tampon phosphate + ClNa, pH 7,6, force ionique 0,2 a montré

(*) Boursier de l'Institut National d'Hygiène (directeur : professeur Bugnard) et du Fonds d'Etude de la Société médicale des Hôpitaux de Paris.

(**) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 juillet 1952.

(1) Nous remercions très vivement M. Ardry des échantillons de γ -Globuline qu'il nous a fournis.

l'existence de deux constituants : γ -Globuline, 77 p. 100 ; β -Globuline, 23 p. 100.

3° Pour certaines expériences, ces deux antigènes ont été séparément adsorbés sur l'alun d'ammonium dans les proportions suivantes :

| | |
|---------------------------------------|--------------------|
| Ovalbumine | 500 mg |
| Alun d'ammonium à 10 p. 100 | 19 cm ³ |
| γ -Globuline | 2 000 mg |
| Alun d'ammonium à 10 p. 100 | 19 cm ³ |

Les solutions sont ensuite ramenées à pH 7 par addition de NaOH N/10. Il se forme un précipité. Après trois lavages successifs, le taux de protéides du précipité a été mesuré par dosage d'N. Le taux de protéides non adsorbés a été également mesuré sur les surnageants à titre de contrôle. Les deuxième et troisième liquides de lavage ne contenaient plus que des traces de protéides.

II. MODE D'IMMUNISATION. — 20 lapins répartis en 4 séries ont été immunisés par voie intraveineuse avec 28 mg d'Ovalbumine et 28 mg de γ -Globuline injectés simultanément de la façon suivante :

Série I : 5 lapins (n^{os} 840, 841, 842, 843, 844) ont reçu quatre injections successives à vingt-quatre heures d'intervalle de 7 mg d'Ovalbumine et 7 mg de γ -Globuline en solution.

Série II : 5 lapins (n^{os} 845, 846, 847, 848, 849) ont été immunisés de la même façon que les 5 précédents, mais avec l'Ovalbumine et la γ -Globuline adsorbées sur alumine.

Série III : 5 lapins (n^{os} 886, 887, 888, 889, 890) ont reçu pendant trois semaines, quatre injections successives à vingt-quatre heures d'intervalle de solutions de 1 mg d'OV et 1 mg de γ -Globuline la première semaine, quatre injections successives à vingt-quatre heures d'intervalle de 2 mg d'OV et 2 mg de γ -Globuline la deuxième semaine, quatre injections successives à vingt quatre heures d'intervalle de 4 mg d'OV et 4 mg de γ -Globuline la troisième semaine.

Série IV : 5 lapins (n^{os} 851, 852, 853, 854, 855) ont été immunisés de la même façon que les 5 précédents, mais avec l'Ovalbumine et la γ -Globuline adsorbées sur alumine (le lapin n^o 851 est mort au cours de l'immunisation).

Tous les lapins ont été pesés et saignés à blanc huit jours après la dernière injection. Leurs poids variaient entre 2,100 kg et 2,900 kg.

Leurs points d'équivalence étant voisins, les sérums d'une même série ont été mélangés en quantités proportionnelles au poids de chaque lapin et le taux d'anticorps anti-Ovalbumine et anti-

γ -Globuline mesuré sur les quatre mélanges par la méthode d'Heidelberger et Kendall [2].

III. COLLECTE DES URINES. — Durant toute la période de l'immunisation, les lapins ont été gardés en cage métabolique et les urines recueillies durant vingt-quatre heures après chaque injection intraveineuse. Après centrifugation, les urines ont été simultanément dialysées contre de l'eau du robinet, puis de l'eau physiologique et concentrées par évaporation à l'aide d'un ventilateur jusqu'à la moitié ou le tiers environ de leur volume initial. Dialyses et concentrations ont été effectuées à la température de 2° C. Un crystal de thymol a été ajouté à chaque échantillon urinaire.

Le taux d'Ovalbumine de chaque échantillon urinaire a été déterminé par précipitation spécifique avec un sérum de lapin anti-Ovalbumine préalablement titré. La présence de γ -Globulines et éventuellement de Conalbumine a été recherchée par l'épreuve du disque avec un sérum de bouc anti- γ -Globuline et un sérum de lapin anti-Conalbumine. Les quantités de γ -Globulines et de Conalbumine trouvées dans les urines n'ont jamais été suffisantes pour pouvoir être mesurées par précipitation spécifique.

A titre de contrôle, nous avons préalablement vérifié qu'une quantité connue de γ -Globulines et d'Ovalbumine pouvait être gardée trois semaines en solution dans de l'urine de lapin en dialyse contre du sérum physiologique, à la température de 2° C, en présence de thymol et mesurée par précipitation spécifique avec une perte n'excédant pas 10 p. 100.

Nous avons également, sur 9 lapins, essayé de précipiter les antigènes dans les urines par le sulfate d'ammonium à saturation, mais cette technique ne nous a jamais permis de recueillir que des traces de protéides, du fait probablement de leur très grande dilution dans le volume urinaire total.

Les urines, enfin, de la première série de lapins, les seules qui contenaient d'importantes quantités d'Ovalbumine, ont été analysées au point de vue immunochimique en milieu gélifié par la technique d'Ouchterlony [5].

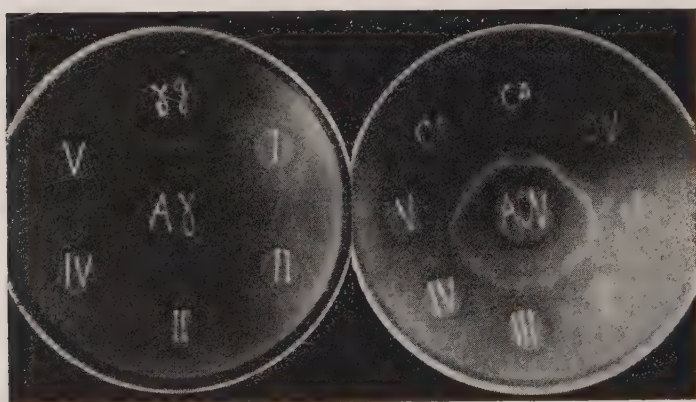
RÉSULTATS.

Nous n'avons trouvé que des traces des protéides injectés dans les urines de lapins des deuxième, troisième et quatrième séries. Il n'existait d'élimination urinaire importante, mesurable par précipitation spécifique, que pour un seul antigène, l'Ovalbumine, et seulement dans la première série de lapins, ceux qui ont reçu 28 mg d'Ovalbumine non adsorbée sur alun en quatre injections successives de 7 mg.

Le tableau I donne le détail des chiffres trouvés pour chacun des lapins, le pourcentage que ces chiffres représentent par rapport à l'antigène injecté et par rapport à l'Ovalbumine proprement dite mesurée d'après les résultats de l'électrophorèse.

TABLEAU I.

| LAPINS | OV ÉLIMINÉE en mg | POURCENTAGE de l'OV injectée | POURCENTAGE de l'OV déterminée électrophorétiquement |
|----------------|----------------------|---------------------------------|--|
| 840 | 7,4 | 26,4 | 35,2 |
| 841 | 8,2 | 29,2 | 39 |
| 842 | 6,7 | 23,9 | 31,9 |
| 843 | 5,9 | 21 | 28 |
| 844 | 2,4 | 8,5 | 11,4 |
| Moyenne. . . . | 6,12 | 21,8 | 29,1 |



I, II, III, IV et V correspondent respectivement aux urines des lapins n° 840, 841, 842, 843, 844, concentrées deux à trois fois.

γ-g, γ-Globuline humaine à 0,2 p. 100; Aγ, sérum de bouc anti-γ-Globuline; OV, Ovalbumine injectée à 0,2 p. 100; CA, Conalbumine à 0,03 p. 100; AOV, sérum de lapin anti-Ovalbumine utilisé pour le dosage de l'Ovalbumine.

Le sérum anti-γ-Globuline ne réagit pas avec les échantillons urinaires. Le sérum anti-Ovalbumine donne avec l'Ovalbumine injectée deux bandes dont l'une correspond à la Conalbumine. L'autre, celle qui correspond à l'Ovalbumine proprement dite, est la seule qui apparaisse avec les urines.

En effet, l'analyse immuno-chimique de ces urines par la technique d'Ouchterlony montre que l'élimination rénale a porté avant tout sur l'Ovalbumine elle-même, tandis que la Conalbumine

mine, qui pourtant réagit nettement avec l'immunsérum utilisé pour la détecter, n'apparaît pas dans les urines. Il en est de même en ce qui concerne la γ -Globuline (voir figure). Les plaques d'Ouchterlony « visualisent » ainsi de façon particulièrement nette le tri opéré par le rein entre l'Ovalbumine d'une part, la Conalbumine et la γ -Globuline d'autre part.

Dans tous les autres échantillons urinaires enfin, si la γ -Globuline et la Conalbumine n'ont jamais donné de résultats positifs avec la technique d'Ouchterlony, les épreuves du disque, par contre, ont été en général positives. L'élimination de ces protéides n'est donc pas nulle, mais peut être estimée à moins de 1 mg, c'est-à-dire une proportion de l'antigène certainement négligeable du point de vue qui nous intéresse.

TABLEAU II.

| MODE D'IMMUNISATION | OV ÉLIMINÉE en mg | ANTI-OV en γ /ml de sérum | γ -GLOBULINES éliminées en mg | ANTI- γ -GLOBULINES en γ /ml de sérum | RAPPORT anti-OV anti- γ |
|--|----------------------|-------------------------------------|--|--|--------------------------------------|
| 1 semaine sans adjuvant (série I) . . | 6,12 | 125 | Trace. | 125 | 1 |
| 1 semaine avec adjuvant (série II) . . | Trace. | 253 | Trace. | 284 | 0,89 |
| 3 semaines sans adjuvant (série III) . | Trace. | 806 | Trace. | 381 | 2,11 |
| 3 semaines avec adjuvant (série IV) . | Trace. | 2 175 | Trace. | 875 | 2,48 |

Le tableau II montre côte à côte le taux d'anticorps anti-Ovalbumine et anti- γ -Globuline des mélanges de sérum correspondant à chaque mode d'immunisation et la quantité moyenne d'antigène éliminé dans chacune des séries. La dernière colonne représente le rapport anticorps anti-Ovalbumine sur anticorps anti- γ -Globuline. La γ -Globuline, en effet, n'étant jamais éliminée qu'à l'état de trace, le taux d'anticorps anti- γ -Globuline peut servir de point de comparaison pour apprécier, toutes choses restant égales par ailleurs, l'effet éventuel de l'élimination urinaire de l'Ovalbumine sur le taux d'anticorps anti-Ovalbumine.

On voit ainsi que les variations du rapport anti-Ovalbumine sur anti- γ -Globuline ne coïncident nullement avec celles de l'élimination de l'Ovalbumine. Cette élimination dans la première série ne semble donc pas avoir eu d'influence appréciable sur le taux d'anticorps anti-Ovalbumine et on ne peut, d'autre part, attribuer à la suppression de l'élimination rénale qu'elles ont entraînée l'efficacité des techniques d'immunisation utilisant les adjuvants ou l'injection de l'antigène à doses progressivement croissantes.

DISCUSSION.

1° MODALITÉS DE L'ÉLIMINATION DES PROTÉIDES AU COURS DE L'IMMUNISATION. — L'absence de passage dans les urines en quantité importante de la γ -Globuline humaine et de la Conalbumine s'explique aisément par leur poids moléculaire élevé (150 000 et 80 000 environ) nettement au-dessus du seuil d'élimination rénale.

L'Ovalbumine de poids moléculaire 44 000 n'a été éliminée en quantité importante que par les lapins de la série I. Cette quantité varie d'ailleurs largement d'un lapin à l'autre, allant, comme le montre le tableau I, de 2,4 mg à 8,2 mg, et représentant 22 p. 100 en moyenne de l'Ovalbumine injectée et 29 p. 100 en moyenne de l'Ovalbumine proprement dite mesurée à l'électrophorèse, seule fraction qui réagissait dans l'urine avec l'immunosérum utilisé pour mesurer l'Ovalbumine. Ces chiffres ne représentent indiscutablement qu'un minimum, étant donné les pertes inévitables, tant au cours de la collecte que de la concentration des urines et dépendent apparemment de nombreux facteurs : voie d'injection, quantité injectée, forme de la molécule, combinaison éventuelle du protéide injecté avec les protéides du sérum [4].

En ce qui concerne l'absence d'élimination de l'Ovalbumine adsorbée sur alumine, notons seulement la nécessité de n'utiliser, comme nous l'avons fait, que le précipité sur alumine après lavage. Dans la technique habituelle, en effet, qui consiste à injecter directement les protéides après adsorption sur alun d'ammonium une quantité plus ou moins importante d'antigène suivant les proportions respectives de protéides et d'alun, n'est pas adsorbée et peut alors être éliminée de façon appréciable, comme nous l'avait montré une série antérieure de 6 lapins.

Chez les lapins de la série III, ceux qui ont été immunisés pendant trois semaines avec des doses progressivement croissantes d'antigène, nous avons recherché l'Ovalbumine séparément dans les urines de chaque semaine, mais les quantités éliminées ont toujours été trop faibles pour être dosées par précipitation spécifique. La première semaine les doses d'antigène utilisées étant minimales, les quantités éliminées ne pouvaient être importantes, mais la deuxième et la troisième semaine surtout, où les doses utilisées étaient beaucoup plus fortes, l'absence d'élimination de l'antigène a probablement été due à la combinaison dans l'organisme d'une partie de l'antigène injecté avec les premiers anticorps formés, combinaison qui a pu être mise en évidence récemment, grâce aux antigènes marqués, dès le quatrième jour de l'immunisation [6].

Soulignons enfin que l'injection concomitante d'Ovalbumine et de γ -Globuline a pu augmenter, dans une certaine mesure, l'élimi-

nation de l'Ovalbumine elle-même et peut expliquer le passage de traces de γ -Globuline et de Conalbumine dans les urines, l'injection simultanée des deux protéides augmentant l'élimination de chacun d'entre eux [4, 4].

2° CONSÉQUENCE DE L'ÉLIMINATION DES PROTÉIDES SUR LEUR ANTIGÉNICITÉ. — Pour étudier le retentissement éventuel de l'élimination rénale de l'Ovalbumine sur son antigénicité nous avons choisi une dose d'antigène relativement faible, vraisemblablement à la limite de celle nécessaire pour susciter l'apparition d'anticorps dosables par précipitation spécifique. Si l'élimination rénale en effet est d'autant plus importante que les quantités de protéides injectés sont plus élevées, il n'en est pas de même en ce qui concerne l'antigénicité plus influencée par la répétition des injections que par leur importance. Injecter de fortes doses aurait donc risqué de majorer le phénomène de l'élimination rénale sans affecter dans la même proportion la formation des anticorps.

Nous n'ignorions pas, d'autre part, qu'à côté de l'influence possible de l'élimination rénale, bien d'autres facteurs interviennent évidemment dans l'antigénicité. Dans le but d'éliminer autant que possible ces facteurs, nous avons recouru à l'injection simultanée de deux antigènes, l'un susceptible d'être éliminé par le rein : l'Ovalbumine, l'autre non : la γ -Globuline afin d'étudier, suivant que l'Ovalbumine avait été éliminée ou non en changeant les modes d'immunisation, les variations du rapport anticorps-anti-Ovalbumine sur anticorps-anti- γ -Globuline, tous les facteurs autres que l'élimination de l'Ovalbumine devant intervenir, *a priori*, de façon semblable sur les deux termes de ce rapport.

L'étude du tableau II montre ainsi que l'on ne peut attribuer à l'élimination urinaire de l'Ovalbumine le faible rapport anti-Ovalbumine sur anti- γ -Globuline de la première série comparativement à la troisième et à la quatrième, puisqu'il est aussi faible dans la deuxième série où, grâce à l'emploi d'adjuvants, l'Ovalbumine n'a été éliminée qu'à l'état de traces. La comparaison, de même, de la première et de la deuxième série, montre que l'efficacité des adjuvants ne peut être attribuée à la suppression de l'élimination rénale qu'ils entraînent puisque l'augmentation du taux d'anticorps est du même ordre pour l'Ovalbumine et la γ -Globuline. On ne peut enfin attribuer non plus à la suppression de l'élimination rénale l'efficacité de la technique d'immunisation utilisant des doses d'antigène progressivement croissantes. L'élévation, en effet, du rapport anti-Ovalbumine sur anti- γ -Globuline de la série I à la série III où, grâce à cette technique, l'élimination de l'Ovalbumine a été supprimée, est du même ordre que de la série II à la série IV, séries où, du fait de

l'adsorption sur alumine, la suppression de l'élimination rénale n'est pas intervenue.

Il serait évidemment imprudent de vouloir tirer des conclusions trop générales d'une étude portant sur quelques antigènes, à des doses déterminées, dans une seule espèce animale. Il semble cependant difficile, devant ces résultats, d'attribuer, même partiellement, comme Haurowitz l'a fait pour la gélatine [3], la non-antigénicité d'un protéide à son élimination rénale, conclusion que pouvait suggérer à première vue le rôle classique du poids moléculaire dans l'antigénicité en général. Antigénicité et élimination rénale sont en réalité deux phénomènes qui n'ont pas les mêmes exigences quantitatives. Même lorsque son faible poids moléculaire permet à un protéide de passer à travers le filtre rénal, il en reste toujours dans la circulation une certaine quantité, qui, si minime soit-elle, par rapport aux quantités éliminées, peut être encore tout à fait suffisante pour susciter la formation d'anticorps si le protéide considéré est un bon antigène.

CONCLUSION.

1° Après injection intraveineuse chez le lapin de 28 mg d'Ovalbumine et de 28 mg de γ -Globuline humaine en solution en quatre injections de 7 mg chacune à vingt-quatre heures d'intervalle, l'Ovalbumine est éliminée en quantité importante, la γ -Globuline humaine ne l'est pas. Cette élimination urinaire n'existe plus lorsque l'Ovalbumine a été préalablement adsorbée sur alumine, ni lorsqu'elle a été injectée, même non adsorbée, en trois semaines à doses progressivement croissantes de 1, 2 et 4 mg.

2° L'élimination rénale de l'Ovalbumine a été sans influence sur le taux d'anticorps anti-Ovalbumine formé. On ne peut de même expliquer, par la suppression de l'élimination rénale qu'elles entraînent, l'efficacité des techniques d'immunisation utilisant les adjuvants ou l'injection de l'antigène à doses progressivement croissantes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. A. BRIGGS. *J. inf. Dis.*, 1938, **63**, 103.
- [2] P. GRABAR, in LOISELEUR. *Techniques de Laboratoire*. Masson et C^{ie}, Paris, 1947.
- [3] F. HAUROWITZ, M. TUNCA et P. SCHWERIN. *Biochem. J.*, 1943, **37**, 249.
- [4] M. E. MARSHALL et H. F. DEUTSCH. *Am. J. Physiol.*, 1950, **163**, 461.
- [5] P. OUCHTERLONY. *Arkiv for Kemi*, 1948, **26 B**, n° 16.
- [6] D. W. TALMAGE, F. J. DIXON, S. C. BUKANTZ et G. J. DAMMIN. *J. Immunol.*, 1951, **67**, 243-255.

SUR LE POUVOIR FIXATEUR DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE DES TERRES DE RÉGIONS TROPICALES

par J. KAUFFMANN, P. TOUSSAINT et M^{lle} G. BOQUEL (*).

(Office de la Recherche Scientifique Outre-Mer,
Laboratoire de Microbiologie du sol.)

Plusieurs méthodes ont été décrites pour déterminer le pouvoir fixateur de l'azote libre des terres. La méthode standard consiste à doser, au bout de vingt-cinq à trente jours de culture, l'azote fixé par une solution de terre à 10 p. 100 enrichie de mannite. Winogradsky [1] emploie un milieu nutritif rendu solide par le gel de silice et ensemencé avec un poids connu de terre. L'azote fixé est dosé après quelques jours de culture à l'étuve.

Nous avons recherché l'influence de la quantité de terre ensemencée sur le rendement de fixation de l'azote (azote fixé en milligrammes rapporté à 100 mg de glucose utilisé). Nous avons opéré en milieu liquide. Cette méthode permet, en effet, de mesurer l'activité fixatrice de la microflore totale du sol (germes aérobies et anaérobies). On évalue en quelque sorte l'activité des agents inhibiteurs et activateurs des germes fixateurs de l'azote atmosphérique. Nos recherches ont porté sur des échantillons de terre provenant de Côte d'Ivoire. Ces échantillons ont été prélevés au début du mois de juillet 1951 (pendant la saison des pluies), respectivement dans une terre sous forêt, dans une terre de forêt maintenue dénudée depuis un an, le troisième échantillon provenant d'une terre de forêt dénudée, abandonnée à la végétation (parcelle repousse). Primitivement, ces deux dernières parcelles étaient recouvertes par la forêt.

Les dosages de l'azote total et du carbone organique par la méthode de Anne ont donné les résultats suivants :

| ÉCHANTILLONS | N TOTAL en g p. 100 | C ORGANIQUE en g p. 100 | N NITRIQUE | C/N |
|--------------------|------------------------|----------------------------|------------|------|
| Forêt. | 0,09 | 0,95 | 0 | 9,69 |
| Parcelle dénudée. | 0,05 | 0,52 | 0 | 9,12 |
| Parcelle repousse. | 0,06 | 0,62 | 0 | 9,53 |

(*) Société française de Microbiologie, séance du 3 juillet 1952.

Nous avons recherché dans ces terres la densité des germes fixateurs de l'azote atmosphérique par la méthode au silico-gel de Winogradsky [2] avec ensemencement de grains de terre. Le gel de silice a été enrichi avec les éléments nutritifs suivants :

| | |
|--|---------------------------|
| Solution saline de Winogradsky | 5 cm ³ p. 100. |
| CO ₃ Ca | 0,2 g p. 100. |
| Glucose | 1 g p. 100. |

Dans ces conditions nous n'avons dénombré aucune colonie d'*Azotobacter* après un séjour de quinze jours à l'étuve à 29°.

En mettant les plaques ensemencées en atmosphère privée d'oxygène (dans un dessiccateur contenant du pyrogallate de sodium) on trouve les résultats suivants :

| ÉCHANTILLONS DE TERRE | GRAINS DE TERRE positifs p. 100 |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Forêt. | 20 |
| Parcelle dénudée. | 10 |
| Repousse. | 100 |

Ces terres sont donc différemment riches en *Clostridium* fixateurs de l'azote libre.

INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE TERRE ENSEMENCÉE SUR LE RENDEMENT DE FIXATION DE L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE.

Pour cette recherche, nous avons utilisé le milieu de culture suivant :

| | |
|--|---------------------------|
| Solution saline de Winogradsky | 5 cm ³ p. 100. |
| CO ₃ Ca | 0,2 g p. 100. |
| Glucose | 0,1 g p. 100. |

Ce milieu est réparti dans les Erlenmeyers de différentes capacités (100, 200 et 500 cm³) à raison de 50 cm³ de milieu par flacon). On réalise ainsi des rapports $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ voisins de 1,5 — 1 et 0,5. L'ensemencement a été réalisé comme suit :

On utilise de la terre séchée et broyée au mortier. On opère le plus stérilement possible. On ensemence avec : 2, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 et 0,05 g de terre chaque Erlenmeyer. Après un mois de culture à l'étuve à 29°, on caractérise la présence des sucres dans les différents milieux (il suffit de II à III gouttes de liquide) à l'aide de l' α -naphtol.

On dose l'azote total du contenu de chaque Erlenmeyer (milieu liquide + terre) par la méthode de Kjeldahl. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux I et II.

Les taux en azote indiqués correspondent à l'azote total dosé en fin d'expérience diminué de l'azote apporté par la terre d'ensemencement.

L'examen des tableaux I et II montre que :

TABLEAU I.

| Quantités de terre ensemencées en g. par flacon | Terre de la parcelle dénudée ensemencée dans des Erlenmeyers de | | | | | | | | |
|---|--|------|------|--------------------|------|------|--------------------|------|------|
| | 100cm ³ | | | 200cm ³ | | | 500cm ³ | | |
| | α | N | R% | α | N | R% | α | N | R% |
| Témoin | + | 0,1 | | + | 0,1 | | + | 0,1 | |
| 0,05 | + | 0,13 | 0,06 | + | 0,14 | 0,08 | + | 0,13 | 0,06 |
| 0,1 | + | 0,13 | 0,06 | + | 0,14 | 0,08 | + | 0,14 | 0,08 |
| 0,2 | o | 0,84 | 1,48 | + | 0,14 | 0,08 | + | 0,14 | 0,08 |
| 0,4 | o | 0,75 | 1,30 | o | 0,75 | 1,30 | + | 0,14 | 0,08 |
| 0,6 | o | 0,67 | 1,14 | o | 0,67 | 1,14 | + | 0,14 | 0,08 |
| 0,8 | o | 0,64 | 1,08 | o | 0,68 | 1,08 | + | 0,42 | 0,64 |
| 1 | o | 0,72 | 1,24 | o | 0,58 | 0,96 | o | 0,61 | 1,02 |
| 2 | o | 0,56 | 0,92 | o | 0,58 | 0,96 | o | 0,64 | 1,08 |

Abbréviation: α = réaction du milieu à 1' α naphtol

1° Il faut une quantité de terre minimum pour provoquer un démarrage de la flore microbienne fixatrice de l'azote libre. Ce « seuil de démarrage » est fonction de l'échantillon de terre et de l'aération du milieu.

Pour la forêt et la parcelle dénudée, il faut d'autant plus de terre pour atteindre le seuil de démarrage que le milieu est plus aéré.

Le « seuil de démarrage » de la terre « repousse » n'est pratiquement pas influencé par l'aération.

Les milieux de culture montrant, après un mois de culture, une réaction positive à l' α -naphtol (cas des flacons ensemencés avec de petites quantités de terre) se sont montrés également positifs après deux mois de culture à l'étuve. Nous avons constaté que, si la croissance n'a pas eu lieu pendant les huit premiers jours après l'ensemencement, la croissance bactérienne est définitivement arrêtée. Le microscope ne révèle alors que quelques germes plus ou moins lysés par champ microscopique.

TABLEAU II.

| Quantités de terre ensemencées en g. par flacon | Terre de "repousse" ensemencée dans des Erlammeyers de : | | | | | | | | |
|---|---|------|------|--------------------|------|------|--------------------|------|------|
| | 100cm ³ | | | 200cm ³ | | | 500cm ³ | | |
| | α | N | R% | α | N | R% | α | N | R% |
| Témoin | + | 0,1 | | + | 0,1 | | + | 0,1 | |
| 0,05 | + | 0,15 | 0,1 | + | 0,1 | 0,0 | + | 0,13 | 0,06 |
| 0,1 | + | 0,14 | 0,08 | + | 0,25 | 0,3 | + | 0,25 | 0,3 |
| 0,2 | o | 0,67 | 1,14 | o | 0,58 | 0,96 | o | 0,70 | 1,2 |
| 0,4 | o | 0,81 | 1,42 | o | 0,81 | 1,42 | o | 0,78 | 1,36 |
| 0,6 | o | 0,56 | 0,92 | o | 0,64 | 1,08 | o | 0,61 | 1,02 |
| 0,8 | o | 0,58 | 0,96 | o | 0,58 | 0,96 | o | 0,56 | 0,92 |
| 1 | o | 0,64 | 1,08 | o | 0,58 | 0,96 | o | 0,53 | 0,86 |
| 2 | o | 0,56 | 0,92 | o | 0,44 | 0,68 | o | 0,50 | 0,8 |

Abréviation: α = réaction du milieu à l' α -naphтол.

2° Le rendement de fixation de l'azote libre passe par un maximum voisin de 1,4 (rendement voisin de celui de l'*Azotobacter chroococcum*). Ce rendement maximum est de même fonction de l'échantillon de terre et de l'aération du milieu. La forêt possède le plus faible rendement maximum. L'aération affecte la terre sous forêt et la parcelle dénudée en provoquant une baisse du rendement. La parcelle dénudée abandonnée à la végétation ne semble pas être affectée par l'aération.

La quantité de terre ensemencée nécessaire pour atteindre ce rendement maximum est aussi fonction de l'échantillon et de l'aération du milieu. Sauf pour la terre « repousse », il faut d'autant plus de terre pour atteindre ce rendement maximum que le milieu est plus aéré.

L'examen microscopique des milieux de culture riches en azote révèle une forte croissance de *Clostridium* et d'*Azotobacter lactigenes*.

Par suite d'une erreur, dont nous nous excusons, le tableau relatif au pouvoir fixateur de la terre de « Forêt » n'a pas été publié. (Note de l'auteur.)

L'azote et le carbone organiques contenus dans la terre ne semblent pas jouer un rôle important sur le rendement et sur le « seuil de démarrage ». En effet, le rendement dans les Erlenmeyer de 100 cm³ ensemencés avec 2 g de terre est le même pour les 3 échantillons de terre. Quant au « seuil de démarrage », celui-ci dépend surtout du $\frac{S}{V}$ des milieux de culture. La densité des *Clostridium* fixateurs dans les différents échantillons de terre déterminée par la méthode au silicogel n'explique pas davantage le phénomène.

Nous avons recherché l'influence de l'azote ammoniacal et nitrique, de l'extrait stérile et non stérile de la terre sous forêt sur l'azote fixé par la terre de la parcelle dénudée. Nous avons utilisé le même milieu de culture que pour l'expérience précédente. Seuls, les Erlenmeyers de 100 cm³ ont été utilisés. Nous avons opéré comme suit :

- | | | |
|----|--|---|
| 1° | Erlenmeyer ensemencé avec la terre de la parcelle dénudée. | |
| 2° | — | + SO ₄ (NH ₄) ₂ |
| 3° | — | + NO ₃ K. |
| 4° | — | + extrait non stérile. |
| 5° | — | + extrait stérile. |

L'azote ammoniacal et nitrique ajouté dans chaque Erlenmeyer correspond à la quantité d'azote total contenu dans 0,5 g de terre sous forêt. De même les extraits stériles et non stériles (dépourvus d'azote ammoniacal et nitrique) correspondent à 0,5 g de terre sous forêt. Les extraits ont été réalisés à froid pour éviter toute hydrolyse. L'extrait stérile a été obtenu par filtration sur bougie L3. Les quantités de terre de la parcelle dénudée ense-

TABLEAU III.

| Poids de terre (parcelle dénudée) ensemencée en g. | Terre seule | Terre + NH ₃ | Terre + NO ₃ K | Terre + extrait stérile | Terre + extrait non sté- rile |
|--|----------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|
| 0,1 | N total | 0,2 | 0,75 | 0,82 | 0,2 |
| | N fixé | 0,14 | 0,22 | 0,28 | 0,14 |
| 0,2 | N total | 0,95 | 0,87 | 0,92 | 0,95 |
| | N fixé | 0,84 | 0,28 | 0,34 | 0,84 |
| 0,4 | N total | 0,92 | 1,06 | 0,92 | 0,92 |
| | N fixé | 0,7 | 0,36 | 0,22 | 0,7 |
| 0,6 | N total | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1 |
| | N fixé | 0,61 | 0,22 | 0,22 | 0,59 |
| 1 | N total | 1,29 | 1,32 | 1,37 | 1,29 |
| | N fixé | 0,67 | 0,22 | 0,28 | 0,67 |

mencées ont été respectivement de 1, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 g par Erlenmeyer.

Après un mois de culture à l'étuve à 29°, nous avons obtenu les résultats résumés dans le tableau III (à noter que, en fin d'expérience, il n'y avait plus trace de NO_3 ou de NH_3 dans les milieux de culture).

De ces résultats, on peut conclure que :

1° L'azote organique dosé dans les milieuxensemencés avec de fortes quantités de terre (0,4, 0,6 et 1 g) est indépendant de l'azote combiné, ou de l'extrait de terre additionné au milieu de culture. Le rendement en azote organique est donc pratiquement le même, que la source de l'azote soit sous forme libre ou combinée.

2° Dans les milieuxensemencés avec de faibles quantités de terre (0,2 et 0,1 g), NH_3 et NO_3 favorisent le démarrage et permettent d'atteindre le maximum de rendement en azote organique en complétant l'azote combiné ajouté dans le milieu de culture par de l'azote gazeux.

CONCLUSIONS.

Il faut ensemenecer une quantité minimum de terre dans le milieu de culture pour provoquer le démarrage de la flore microbienne fixatrice de l'azote libre. Cette quantité minimum de terre, que nous avons appelée « seuil de démarrage », est fonction de la nature de la terre et de l'aération du milieu de culture.

Le rendement de fixation de l'azote libre par la microflore totale d'un sol est fonction de la quantité et de la nature de la terreensemencée, ainsi que de l'aération du milieu de culture. Pour la terre sous forêt et surtout pour la terre « nue », il faut ensemenecer d'autant plus de terre pour atteindre le « seuil de démarrage » et le rendement maximum que le milieu de culture est plus aéré. Le « seuil » et le rendement de la terre nue abandonnée à la végétation ne sont pratiquement pas influencés par l'aération. L'azote et le carbone organiques contenus dans la terre ainsi que la densité des germes fixateurs de celle-ci ne semblent pas jouer un rôle important sur le rendement et sur le « seuil de démarrage ».

Un faible apport en azote ammoniacal ou nitrique dans une terre pauvre en bactéries actives diminue le « seuil de démarrage » et provoque une fixation de l'azote libre par la microflore fixatrice qui, sans cet apport en azote combiné, demeurerait inactive et sans action dans le sol.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1926, **40**, 445.
- [2] S. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1932, **48**, 89.

LIVRES REÇUS

P. Wood. — *Diseases of the heart and circulation.* Eyre et Spottiswoode, 15, Bedford Street, W. C. 2. 1950, 545 p., 21 fig. Prix : 70 s.

Voici un traité général concernant la cardiologie classique et les nouvelles connaissances dues à l'électro-cardiographie, à l'angiocardio-graphie, à la cathétérisation cardiaque. L'auteur tente de maintenir un juste équilibre entre l'homme et ses instruments, l'opinion individuelle et la statistique, les points de vue traditionnels et les points de vue hétérodoxes, les tests courants et les tests spéciaux, la médecine pratique et la médecine théoricienne. Ce livre est destiné plus particulièrement aux médecins qui s'intéressent à l'aspect clinique de la cardiologie, mais les étudiants, les médecins non spécialisés et les médecins spécialisés dans d'autres branches de la médecine que la cardiologie le liront également avec profit. Les 6 premiers chapitres concernent les méthodes d'investigation et les désordres courants qui peuvent être associés à n'importe quelle maladie du système cardiaque. Chacun des chapitres suivants décrit une cardiopathie particulière, classée selon son étiologie. La table peut servir de guide pour établir un diagnostic différentiel.

M. G.

L. Bovet. — *Les aspects psychiatriques de la délinquance juvénile.* Monographie de l'Organisation Mondiale de la Santé n° 1, Genève, 1951, 95 p. Prix : 4 fr. suisses.

Première monographie faisant partie d'une nouvelle série de publications de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette étude a été préparée à titre de contribution au programme des Nations Unies en vue de la prévention de la criminalité et du traitement des délinquants. Toutefois elle se présente d'une façon qui doit intéresser non seulement le médecin, le psychologue, le travailleur social, l'éducateur et le magistrat mais aussi tout lecteur qui se rend compte de l'importance de la question. L. Bovet nous donne un excellent aperçu des théories communément admises sur la délinquance juvénile, son étiologie, sa prophylaxie et son traitement. Il vise à faire ressortir la multiplicité des problèmes qui se posent plutôt qu'à les résoudre.

M. G.

I^{er} Congrès International d'Allergie. *Volume du Congrès.* (S. Karger, édit., Bâle, New-York.)

L'intérêt grandissant qui s'attache à l'étude des processus allergiques a conduit à l'organisation à Zurich, au mois de septembre 1951, du I^{er} Congrès International d'Allergie. Ce Congrès, présidé par le professeur Ch. W. Löffler, avait réuni des spécialistes venus de tous les points du globe et, parmi ceux-ci, on pouvait reconnaître les plus célèbres. Le signataire de ces lignes, qui eut le privilège d'y assister, est personnellement à même d'en certifier toute l'importance.

Aujourd'hui paraît le volume du Congrès. C'est un ouvrage de 1143 pages dont la présentation, réellement magnifique, fait le plus grand honneur à ceux qui l'ont édité. Mais son contenu ne retient pas moins l'attention car c'est devant un nombre considérable de communications, de rapports et de sujets très variés que l'on se trouve soudain placé. Ceci, toutefois, ne doit pas étonner, attendu que, comme le rappelait spirituellement le président Löffler dans son discours de clôture, « l'allergie peut être comparée au spectre solaire... Comme lui, elle réunit le faisceau de teintes variées en une unité harmonieuse... elle n'est pas nettement limitée... »

Il est naturellement impossible de rapporter ici toutes les notions importantes qu'on peut trouver exposées dans un tel ouvrage. Donnons au moins le titre de quelques-uns des rapports : *Maladies allergiques et maladies accompagnées par une sensibilisation* (A. R. Rich) ; *Importance sociale des maladies allergiques* (D. A. Williams) ; *Distribution géographique des maladies allergiques* (P. Sangiorgi) ; *Etudes histologiques des lésions allergiques* (M. G. Bohrod, G. Miescher, J. Firket) ; *Lieux de formation des anticorps* (A. Delaunay) ; *Signification biologique des anticorps complets et incomplets* (J. R. Marrack) ; *Le pouvoir antigénique direct des haptènes* (J. Loiseleur) ; *Pathogénèse des réactions allergiques* (D. Bovet et V. Serafini) ; *Réflexions sur la pathogénie de l'allergie* (A. Tzanck) ; *Mécanisme d'action des antihistaminiques de synthèse* (B. N. Halpern) ; *L'allergie du système respiratoire* (J. Duchaine), etc., etc... Je regrette de ne disposer ici que d'une place limitée car presque tous les rapports faits à Zurich eussent été dignes d'être signalés.

Le principal bienfait des grands Congrès internationaux est de donner, à un moment défini, une vue d'ensemble de telle ou telle branche de la Science. Les volumes qui rapportent leurs travaux méritent d'être considérés comme autant de jalons dans la marche de nos connaissances.

Le volume, analysé dans ces lignes, apporte une image très fidèle du Congrès et de l'Allergie 1951. Aujourd'hui, son intérêt scientifique est indiscutablement considérable mais, demain, il restera, à titre historique, un document précieux pour tous les allergologistes.

A. DELAUNAY.

ERRATUM

Ces *Annales*, 1952, t. 83, p. 514, Mémoire Drouhet et Mariat, 2^e ligne de l'explication de la planche. Au lieu de : « tableau I », lire : « tableau II ». Ajouter : « III, milieu à l'arginine... ».

Le Gérant : G. MASSON.